

# Untersuchungen zum Vorkommen von Mykoplasmen und Herpesviren bei freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Mediterranen Landschildkröten (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca graeca* und *Testudo graeca iberica*) in Frankreich und Marokko

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**KARINA ANGELA MATHES**



VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
édition scientifique

ISBN 3-89687-655-4

## **ANGABEN ZU FOTOS AUF DEM BUCHUMSCHLAG:**

### **1. Fotos Umschlag vorne:**

#### Umschlag Titelseite links:

Tupferprobenentnahme *Testudo graeca graeca*

#### Umschlag Titelseite mittig:

Kopfportrait *Testudo hermanni hermanni* mit Rhinitis

#### Umschlag Titelseite rechts:

Nasenspülprobe *Testudo graeca graeca*

### **2. Foto Umschlag hinten:**

#### Umschlag hinten

*Testudo graeca graeca* in Marokko

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2003

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE  
[www.vvb-ips.de](http://www.vvb-ips.de)

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

**Untersuchungen zum Vorkommen von Mykoplasmen und  
Herpesviren bei freilebenden und in Gefangenschaft  
gehaltenen Mediterranen Landschildkröten (*Testudo hermanni*,  
*Testudo graeca graeca* und *Testudo graeca ibera*) in Frankreich  
und Marokko**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

KARINA ANGELA MATHES

Tierärztin aus Ingelheim

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. F. Kaleta

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2003

*Meinen Liebsten*



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1     Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2     Literaturübersicht.....</b>	<b>7</b>
2.1    Mykoplasmen .....	7
2.1.1 <i>Mycoplasma</i> spp. allgemein .....	7
2.1.1.1    Einordnung der Mykoplasmen innerhalb der Bakterien .....	7
2.1.1.2    Charakteristika .....	8
2.1.1.3    Morphologie und Klassifikation .....	8
2.1.1.4    Wirts- und Organtropismus .....	10
2.1.1.5    Pathogenität und Erkrankungen bei den einzelnen Tierarten .....	11
2.1.1.6    Diagnostik .....	13
2.1.1.7    Therapie und Prophylaxe .....	15
2.1.2    Mykoplasmen bei Reptilien .....	16
2.1.2.1    Mykoplasmen bei Schlangen, Krokodilen und Alligatoren .....	16



2.1.2.2	Mykoplasmeninfektionen der Schildkröten.....	17
2.1.2.2.1	Eigenschaften der bisher aus Schildkröten gewonnenen <i>Mycoplasma</i> -Isolate .....	17
2.1.2.2.2	Klinik und Pathologie.....	19
2.1.2.2.3	Übertragungswege.....	27
2.1.2.2.4	Diagnostik .....	29
2.1.2.2.5	Therapie .....	36
2.2	Herpesviren .....	40
2.2.1	<i>Herpesviridae</i> .....	40
2.2.1.1	Morphologie und Klassifikation .....	40
2.2.1.2	Unterschiedliche Einteilungsmethoden der Herpesviren bei Reptilien .....	44
2.2.2	Herpesviren der Schildkröten .....	45
2.2.2.1	Herpesviren bei Wasserschildkröten und Meeresschildkröten.....	47
2.2.2.2	Herpesviren bei Landschildkröten .....	55
2.2.2.2.1	Klinik.....	55
2.2.2.2.2	Übertragung .....	60

---

2.2.2.2.3	Diagnostik .....	62
2.2.2.2.4	Therapie und Kontrolle .....	74
2.3	Weitere Ursachen für Krankheiten des oberen Respirations- und Digestionstraktes der Schildkröten .....	76
2.3.1	Infektiöse Ursachen .....	77
2.3.1.1	Parasiten .....	77
2.3.1.2	Pilze .....	78
2.3.1.3	Bakterien .....	79
2.3.1.4	Viren .....	84
2.3.2	Nichtinfektiöse Ursachen .....	89
2.3.2.1	Mangelerkrankungen und Haltungsfehler .....	89
2.3.2.2	Traumata .....	90
2.3.2.3	Neoplasien .....	91
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>93</b>
3.1	Material .....	93
3.1.1	Verwendete Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien .....	93
3.1.1.1	Mykoplasmen-Anzucht und PCR .....	93

3.1.1.1.1	Für die Mykoplasmen-Anzucht verwendetes SP4-Medium (SP4-Mykoplasmennährmedium ) .....	93
3.1.1.1.2	Für die Mykoplasmen-PCR verwendete Pufferlösungen .....	96
3.1.1.1.3	Für die Mykoplasmen-PCR eingesetzte Reagenzien und Isolate ...	98
3.1.1.1.4	Für die Elektrophorese und Restriktionsenzymanalyse eingesetzte Reagenzien und Isolate .....	100
3.1.1.2	Mykoplasmen-ELISA.....	102
3.1.1.2.1	Für den Mykoplasmen-ELISA verwendete Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien .....	102
3.1.1.3	Herpesvirusnachweis .....	105
3.1.1.3.1	Für den Herpesvirusnachweis verwendete Medien und Pufferlösungen .....	105
3.1.1.4	Charakterisierung der Virusisolate .....	109
3.1.1.4.1	Zur Charakterisierung der Virusisolate verwendete Reagenzien ..	109
3.1.1.4.2	Für Virustitration und Herpesvirus-Neutralisationstest verwendete Zellkulturen, Kontrollen und Virusisolate .....	109
3.1.2	Weitere Materialien und Geräte .....	111
3.1.3	Untersuchte Proben und Einteilung der Schildkröten.....	113

---

3.1.3.1	Vorgenommene Gruppierungen der untersuchten Schildkröten ...	117
3.1.3.2	Klinische Untersuchung der Schildkröten.....	120
3.1.3.3	Entnahme der Nasenspülproben .....	120
3.1.3.4	Blutprobenentnahme .....	121
3.1.3.5	Entnahme der Tupferproben .....	122
3.2	Methoden .....	123
3.2.1	Methoden zur Untersuchung auf Mykoplasmen .....	123
3.2.1.1	Kultureller Mykoplasmennachweis .....	123
3.2.1.2	Mykoplasmen-PCR .....	125
3.2.1.2.1	Aufarbeitung des Ausgangsmaterials (Template-Präparation) .....	125
3.2.1.3	Elektrophorese im Agargel .....	127
3.2.1.4	Restriktionsenzymanalyse .....	129
3.2.1.5	Mykoplasmen-ELISA.....	130
3.2.2	Methoden der Untersuchung auf Herpesviren.....	133
3.2.2.1	Kultureller Herpesvirusnachweis .....	133
3.2.2.1.1	Aufarbeitung des Ausgangsmaterials zum kulturellen Herpesvirusnachweis .....	133

---

3.2.2.1.2	Vorbereitung benötigter Zellkulturen und anschließende Inokulation aufgearbeiteter Proben .....	133
3.2.2.2	Charakterisierung der Virusisolate .....	135
3.2.2.2.1	Chloroformbehandlung.....	135
3.2.2.2.2	Verhalten der Zellkultur in Anwesenheit von 5-Jod-2-Desoxy-Uridin .....	136
3.2.2.2.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung .....	137
3.2.2.3	Herpesvirus-Neutralisationstest .....	138
3.2.2.3.1	Für die Neutralisationsteste verwendete Virusisolate .....	138
3.2.2.3.2	Durchführung der Virustitration .....	139
3.2.2.3.3	Durchführung des Herpesvirus-Neutralisationstestes .....	140
3.2.3	Statistische Auswertung der vorgenommenen Untersuchungen.....	141
3.2.3.1	Allgemeiner Überblick .....	141
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>144</b>
4.1	Auswertung der klinischen Symptome erkrankter Schildkröten .....	144
4.2	Auswertung der Untersuchungen auf Mykoplasmen.....	149

---

4.2.1	Untersuchung der Nasenspülproben auf Mykoplasmen mittels Kulturverfahren .....	149
4.2.2	Restriktionsenzymanalyse <i>Mycoplasma</i> -verdächtiger Isolate .....	153
4.2.3	Auswertung der Ergebnisse der Untersuchungen auf Mykoplasmen in den Nasenspülproben mittels Kultivierung und PCR.....	158
4.2.4	Serologische Untersuchung auf Mykoplasmen-Antikörper mittels ELISA.....	164
4.3	Auswertung der Untersuchungen auf Herpesviren.....	173
4.3.1	Untersuchung der Tupferproben auf Herpesvirus mittels Zellkultur .....	173
4.3.2	Serologische Untersuchung auf Herpesvirus-Antikörper mittels Herpesvirus-Neutralisationstest.....	176
4.4	Korrelationen zwischen den Ergebnissen der klinischen, bakteriologischen, virologischen und serologischen Untersuchungen .	184
4.4.1	Gesundheitszustand und Sterblichkeitsrate der untersuchten Schildkröten.....	185
4.4.2	Korrelation der Ergebnisse der Mykoplasmen-PCR und der klinischen Untersuchung .....	186
4.4.3	Korrelation der Ergebnisse des Mykoplasmen-ELISA und der klinischen Untersuchung .....	188

4.4.4	Korrelation der Ergebnisse der Untersuchung auf Herpesvirus und der klinischen Untersuchung .....	191
4.4.5	Korrelation der Ergebnisse des Herpesvirus-Neutralisationstests und der klinischen Untersuchung .....	191
4.4.6	Korrelation der Ergebnisse des Mykoplasmen-ELISA und der Mykoplasmen-PCR.....	193
4.4.7	Korrelation der Ergebnisse der Mykoplasmen-PCR und des Herpesvirus-Neutralisationstest .....	194
4.4.8	Korrelation der Ergebnisse des Herpesvirus-Neutralisationstests und des Mykoplasmen-ELISA .....	195
4.4.9	Korrelation der Ergebnisse der Untersuchung auf Herpesvirus und anderer durchgeführter Untersuchungen .....	196
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>197</b>
5.1	Mykoplasmen bei Landschildkröten .....	197
5.1.1	Kultivierung und PCR der Mykoplasmen.....	198
5.1.2	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Mykoplasmen.....	202
5.1.3	Mykoplasmen und klinische Erkrankungen .....	203
5.2	Herpesviren .....	206

---

5.2.1	Herpesvirusisolate aus Tupferproben .....	207
5.2.2	Neutralisationstest mit drei Herpesvirus-Isolaten .....	208
5.2.3	Herpesviren und klinische Erkrankungen .....	213
5.2.4	Weitere Auslöser des Rhinitis-Stomatitis-Komplexes und zur Krankheit beitragende Streßfaktoren .....	215
5.3	Korrelationen und Kontrolle .....	222
5.3.1	Synergismus von Herpesviren und Mykoplasmen ? .....	222
5.3.2	Therapie, Vakzine und empfohlene Präventivmaßnahmen .....	224
5.3.3	Abschlußbemerkungen .....	226
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>229</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>233</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>236</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>279</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AD1	=	Adaptationsgehege im Schildkrötendorf in Gonfaron (Var)
Aqua bidest.	=	Aqua bidestillata
CPE	=	zytopathischer Effekt
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	=	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
ECACC	=	European Collection of Cell Cultures
ELISA	=	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
FKS	=	Fetales Kälberserum
FP	=	Fibropapillom
G	=	Geschlecht
G.A. / g.a.	=	Neuankömmling im Schildkrötendorf (gerade angekommen)
GePard	=	<i>Geochelone pardalis</i> (Pantherschildkröte)
GoAg	=	<i>Gopherus agassizii</i> (Wüstenschildkröte)
GoPo	=	<i>Gopherus polyphemus</i> (Gopherschildkröte)
GPD	=	Graufleckenerkrankung ( <u>G</u> ray <u>P</u> atch <u>D</u> isease)

---

GTFP	=	Fibropapillome bei <i>Chelonia mydas</i> ( <u>G</u> reen <u>T</u> urtle <u>F</u> ibropapilloma)
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
IUDR	=	5-Iod-2-Desoxy-Uridin
J	=	juvenil (per definitionem < als 10 cm Panzerlänge)
k.A.	=	keine Angaben
KID <sub>50</sub>	=	Kultur-infektiöse Dosis 50 %
Klinik	=	Klinik im Schildkrötendorf
KM	=	Körpermasse
LETD	=	Konjunktivitis-Tracheitis-Pneumonie-Komplex ( <u>L</u> ung <u>E</u> ye <u>T</u> rachea <u>D</u> isease)
LETV	=	Virus des Konjunktivitis-Tracheitis-Pneumonie-Komplexes ( <u>L</u> ung <u>E</u> ye <u>T</u> rachea <u>V</u> irus)
Levant	=	ausgewildert auf der Ile du Levant, Südfrankreich
LRTD	=	<u>L</u> ower <u>r</u> espiratory <u>t</u> ract <u>d</u> isease (Erkrankung des unteren Respirationstraktes)

---

M	=	männlich
Marrak	=	in Marrakesch lebend**
MEM	=	Minimum Essential Medium Eagle´s
mRNA	=	Messenger-Ribonukleinsäure
ND	=	nicht durchgeführt
NT	=	Neutralisationstest
N.U.	=	nicht untersucht
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
RFLP	=	Restriktionsenzymanalyse ( <u>R</u> estriktion <u>E</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism Analysis)
R1	=	Reproduktionsgehege 1 im Schildkrötendorf
R2	=	Reproduktionsgehege 2 im Schildkrötendorf
R3	=	Reproduktionsgehege 3 im Schildkrötendorf
Runny nose	=	rezidivierender Schnupfen der Landschildkröten
SA2/3	=	Gehege der subadulten THH, Pferch 3 im Schildkrötendorf

---

SA2/4	=	Gehege der subadulten THH, Pferch 4 im Schildkrötendorf
SA2/9	=	Gehege der subadulten THH, Pferch 9 im Schildkrötendorf
SOPTOM	=	Station d'observation et de protection des tortues des Maures (Vereinigung zum Schutz der Schildkröten im Maurenmassiv, Südfrankreich)
TG	=	<i>Testudo graeca</i>
TGG	=	<i>Testudo graeca graeca</i>
TGG 2	=	Gehege der männlichen <i>Testudo graeca graeca</i> im Schildkrötendorf
TGG 3	=	Gehege der weiblichen <i>Testudo graeca graeca</i> im Schildkrötendorf
TGG N	=	Gehege der juvenilen <i>Testudo graeca graeca</i> im Schildkrötendorf (per definitionem mit einer Carapaxlänge von weniger als 10 cm)
TGI	=	<i>Testudo graeca ibera</i> /  Gehege der <i>Testudo graeca ibera</i> im Schildkrötendorf

THB	=	<i>Testudo hermanni boettgeri</i> /  Gehege der <i>Testudo hermanni boettgeri</i> im  Schildkrötendorf
THH	=	<i>Testudo hermanni hermanni</i> /  Gehege der <i>Testudo hermanni hermanni</i> im  Schildkrötendorf
THHyb	=	<i>Testudo hermanni</i> Hybride /  Gehege der <i>Testudo hermanni</i> Hybriden im  Schildkrötendorf
URTD	=	<u>U</u> pper <u>r</u> espiratory <u>t</u> ract <u>d</u> isease  (Erkrankung des oberen Respirationstraktes)
UV	=	Ultraviolett
VB	=	Vallon de Badelune *, Südfrankreich
VdT	=	Village des tortues  (Schildkrötendorf in Gonfaron, Var, Südfrankreich)
W	=	weiblich

---

ZNS            =        Zentralnervensystem

\*                =        freilebend in Frankreich

\*\*               =        freilebend in Marokko



## 1 Einleitung

Seit ca. 20 Jahren ist die Herpesviruserkrankung der Landschildkröten als ein aktuelles und gefürchtetes Problem bei Schildkrötenhaltern und Tierärzten bekannt. Diese in ganz Europa und auch auf anderen Kontinenten vorkommende nekrotisierende Stomatitis der Landschildkröte zeigt häufig einen epidemischen Verlauf. Klinisch zeigt sich diese Erkrankung vor allem in Form einer nekrotisierenden Stomatitis und Pharyngitis, welche durch die Ausbildung von Belägen in Maulhöhle und Rachenraum häufig zur vollständigen Verlegung des oberen Digestions- und Respirationstraktes führen kann. Beim Versuch, diese Beläge zu entfernen, kommt es in der Regel zu starken Schleimhautblutungen in den betroffenen Regionen. Zusätzlich können als weitere Symptome Rhinitis, Enteritis und zentralnervöse Störungen auftreten. Die Herpesviruserkrankung führt häufig zum Massensterben in zuvor über Jahre stabilen Beständen und kann somit innerhalb kurzer Zeit das Auslöschen ganzer Zuchtgruppen von Schildkröten zur Folge haben. Bisher erfolgte der Nachweis der Herpesviren bzw. deren Antikörper lediglich bei in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten, Studien über das Vorkommen bei freilebenden Schildkröten wurden bislang nicht dokumentiert.

Eine weitere Erkrankung bei freilebenden oder in Gefangenschaft gehaltenen Landschildkröten mit ähnlich gravierenden Symptomen stellt das „Runny-nose-Syndrom“ dar, welches durch eine Mykoplasmeninfektion ausgelöst wird. Bei dieser v. a. bei Wüsten- und Gopherschildkröten (*Gopherus agassizii* und *Gopherus polyphemus*) in den USA vorkommenden Krankheit gelang bereits



der Nachweis von *Mycoplasma agassizii* als ein auslösendes Agens. Hierbei zeigen die betroffenen Tiere chronische, häufig rezidivierende Rhinitis und Konjunktivitis. Der dabei auftretende Nasenausfluß kann seröser Natur sein, es kann allerdings ebenso zu stark eitrigem oder blutigem Sekretfluß der Nase kommen. Auch bei dieser Erkrankung kommt es zu akuten Todesfällen und damit zur Bedrohung ganzer Bestände. Nachweise von Mykoplasmen und deren Antikörper erfolgten bereits bei wildlebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Tieren. Allerdings beschränken sich die bislang publizierten Untersuchungen auf den amerikanischen Kontinent, Analysen über das Vorkommen dieser Erreger in Europa wurden bisher noch nicht durchgeführt.

In Gonfaron, einem kleinen, im Maurenmassiv, ca. 50 km nördlich von Toulon an der Côte d'Azur gelegenen, Ort in Südfrankreich befindet sich das sogenannte "Village des tortues", das Schildkrötendorf. Das Hauptinteresse des Schildkrötendorfes gilt den *Testudo hermanni hermanni*, der in dieser Region noch in Wildpopulationen vorkommenden Griechischen Landschildkröte. Initiator und Organisator dieses Dorfes ist die sogenannte „SOPTOM“ (Station d'observation et de protection des tortues des Maures), eine französische Vereinigung zum Schutz der Schildkröten im Maurenmassiv. Diese Organisation hat es sich zum Ziel gesetzt, sowohl durch Nachzucht- und Schutzprogramme der wenigen noch freilebenden Schildkrötenbestände als auch durch Analyse und Optimierung ihres Lebensraumes maßgeblich zur Erhaltung der *Testudo hermanni hermanni* in Südfrankreich beizutragen.

Zusätzlich zur Haltung der Griechischen Landschildkröte erfolgte im Schildkrötendorf über Jahre hinweg auch die Aufnahme von diversen Landschildkröten, welche zuvor bei privaten Haltern in ganz Frankreich gelebt hatten. 1993 konnten im Schildkrötendorf in Gonfaron verschiedene Krankheitssymptome der Landschildkröten beobachtet werden. So zeigten sowohl Griechische als auch Maurische Landschildkröten (*Testudo hermanni* und *Testudo graeca*) typische Anzeichen einer Herpesviruserkrankung. Im Verlaufe des Jahres 1993 kam es im "Village des tortues" zu einem massiven Schildkrötensterben, welches mit nekrotisierender Stomatitis, Glossitis, und/oder Pharyngitis und Rhinitis einherging. Auch zentralnervöse Störungen in Form von Kreisbewegungen und massiver Salivation traten bei einem Teil der betroffenen Tiere auf.

Dr. Bobby R. Collins, Tiermediziner der Wildtierabteilung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität in Gainesville, Florida (College of Veterinary Medicine, Department of Small Animal Clinical Sciences, University of Florida, Gainesville; USA), untersuchte daraufhin die Tiere in Gonfaron serologisch, pathohistologisch und bakteriologisch. Dabei wurden die Seren der Tiere mittels ELISA auf Antikörper gegen Mykoplasmen untersucht, weitere Schildkröten seziert und deren Organe sowohl histologisch, als auch zum Teil bakteriologisch untersucht. Bei dieser Untersuchung wurden im Blut von Griechischen und Maurischen Landschildkröten Antikörper gegen *Mycoplasma agassizii* gefunden. Zusätzlich erfolgte bei den 1993 durchgeführten Untersuchungen der Nachweis von Viruspartikeln mit dem Elektronenmikroskop im Schleimhautepithel der Bronchien und des Gaumens,

in der Trachea, den Alveolen, Hepatozyten und in Neuronen- und Gliazellen des Zentralnervensystems. Die Morphologie der Viruspartikel wurde dabei als Herpesvirus-ähnlich beschrieben. Weiterführende Untersuchungen wurden jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht vorgenommen.

Aufgrund dieses Sachverhaltes entstand im Juli 1995 auf einem Kongreß in Gonfaron die Grundidee einer weiterführenden wissenschaftlichen Untersuchung. Angestrebt wurde eine genauere Feststellung des Infektionsstatus mit Herpesviren und Mykoplasmen der Schildkröten in der oben erwähnten Aufzucht- und Auffangstation in Gonfaron, der freilebenden Griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni hermanni*) der umliegenden Regionen und von wildlebenden Maurischen Landschildkröten, *Testudo graeca graeca*, in Marokko als Vergleichsregion.

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden die Blut-, Tupfer- und Nasenspülproben, welche 1996 und 1997 bei lebenden Tieren entnommen wurden. Diese werden auf Herpesviren und Mykoplasmen untersucht. Hierbei wird sowohl eine Überprüfung der Proben auf Mykoplasmen und deren Antikörper, als auch auf Herpesviren und deren Antikörper durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgen an Populationen wildlebender Landschildkröten in Frankreich und Marokko. Ebenso werden im Schildkrötendorf in Gonfaron gehaltenen Landschildkröten, bzw. Tiere, die von Privatpersonen aus ganz Frankreich dorthin gebracht wurden und zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei Kontakt mit den Tieren aus dem „Village des tortues“ gehabt hatten, getestet.

Bei beiden Krankheitskomplexen wurden bisher in Europa wenn überhaupt nur separate Untersuchungen an in Gefangenschaft gehaltenen Tieren vorgenommen. Inwieweit diese Krankheitsbilder in der Natur bei freilebenden Schildkröten in Europa verbreitet sind, wurde bisher noch nicht überprüft. Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen wurde bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit soll schwerpunktmäßig zur Klärung folgender Fragen beitragen werden:

Gibt es einen Zusammenhang zwischen Herpesvirus - und *Mycoplasma*-Infektionen und auftretenden klinischen Symptomen?

Besteht ein Synergismus zwischen Mykoplasmen und Herpesviren?

Inwieweit haben diese Infektionen schon Verbreitung in Frankreich gefunden?  
Welche Gefahren ergeben sich aus einer nur bedingt vollzogenen räumlichen Trennung verschiedener Arten und Unterarten in Gefangenschaft gehaltener Landschildkröten?

Besteht bereits eine Infektion der wenigen verbliebenen Wildpopulationen von *Testudo spp.* mit Herpesviren und Mykoplasmen in Frankreich oder Marokko?

Welche Vorsichtsmaßnahmen müssen vor einer möglichen Auswilderung durchgeführt werden, bzw. welche Untersuchungen sollten in jedem Falle vorgenommen werden?

Welche Konsequenzen ergeben sich aus den Untersuchungsergebnissen in Bezug auf möglicherweise erfolgende Relokalisationen in Gefangenschaft gehaltener Landschildkröten?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Mykoplasmen

#### 2.1.1 *Mycoplasma* spp. allgemein

##### 2.1.1.1 Einordnung der Mykoplasmen innerhalb der Bakterien

Grundsätzlich werden die Bakterien in drei große Gruppen eingeordnet: den grampositiven Stamm der *Firmicutes*, den gramnegativen Stamm der *Gracilicutes* und den Stamm der zellwandlosen *Tenericutes* (SELBITZ, 2002). Mykoplasmen gehören zum Stamm der *Tenericutes* und gelten als die kleinsten selbst-reproduzierenden pathogenen Prokaryonten (RAZIN, 1981,1992). Alle Vertreter der *Tenericutes* zeichnen sich durch das Fehlen einer Zellwand und eine geringe Zell- und Genomgröße im Vergleich mit anderen Bakterien aus (SELBITZ, 2002). Aufgrund des Fehlens einer Zellwand kommt es zu pleomorphen Zellformen und einer Resistenz gegen an der Zellwand der Bakterien angreifende Antibiotika wie Penicilline. Die geringen Zell- und Genomgrößen bedingen eine eingeschränkte Stoffwechselkapazität, eine Anzucht nur auf sehr komplexen Medien und setzen eine parasitäre oder kommensale Lebensweise dieser Bakterien voraus. Guanin und Cytosin sind nur in geringen Anteilen in der DNS enthalten (SELBITZ, 2002). Laut SELBITZ (2002) gehört dem Stamm der *Tenericutes* die Klasse der *Mollicutes* an. *Mollicutes* (mollis= weich; cutis= Haut) steht für den besonderen Aufbau der Zytoplasmenmembran dieser Klasse (RAZIN, 1981).

### 2.1.1.2 Charakteristika

Laut MASOVER und HAYFLICK (1985) können neben dem erforderlichen Wirtsspektrum und der Pathogenität kulturelle Charakteristika wie spezielle Wachstumsfaktoren, Mediumbestandteile, Kultivierungstechniken, optimale Inkubationstemperatur, Anforderungen an pH-Wert und Zusammensetzung der umgebenden Gase zur grundsätzlichen Unterscheidung der Mollikutenspezies herangezogen werden. Auch biochemische Eigenschaften wie Glukosefermentation, Hydrolyse von Arginin oder Harnstoff, Karotinoidproduktion und genetische Charakteristika können zur Differenzierung der *Mollicutes* beitragen (MASOVER und HAYFLICK, 1985). So kann die Klasse der *Mollicutes* in die vier Ordnungen *Mycoplasmatales*, *Entoplasmatales*, *Acholeplasmatales* und *Anaeroplasmatales* mit den Familien der *Mycoplasmataceae*, *Entoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* und *Anaeroplasmataceae* unterteilt werden (SELBITZ, 2002). Innerhalb der Familie der *Mycoplasmataceae* erfolgt eine Differenzierung der Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma* unter anderem aufgrund des unterschiedlichen Harnstoffspaltungsvermögens.

### 2.1.1.3 Morphologie und Klassifikation

Eine Einteilung der Mykoplasmen und die Benennung neuer Spezies erfolgt seit Anfang der Achtziger Jahre durch das Internationale Komitee der systematischen Bakteriologie (International Committee of Systematic Bacteriology; ICBS), welches sich in einem Unterkomitee mit der Taxonomie der *Mollicutes* beschäftigt und das Internationale Journal der systematischen

Bakteriologie für die Publikation von Neuerungen verwendet (RAZIN, 1992). Laut GEDEK (1993) sind Mykoplasmen, welche auch als Pleuropneumonia-like organisms (PPLO) bezeichnet werden, unbewegliche, gramnegative Organismen. Die dreischichtige, ca. 7,5-10 nm dicke Zytoplasmamembran setzt sich vornehmlich aus Lipiden und Proteinen zusammen. Daher lassen sich die Mykoplasmen wie alle *Mollicutes* mit herkömmlichen Färbemethoden schlecht darstellen und weisen eine Pleomorphie je nach umgebenden Milieufaktoren auf. Aufgrund ihrer geringen Größe von 0,1- 0,3 µm können Mykoplasmen übliche bakteriendichte Filter mühelos passieren (GEDEK, 1993). Laut GEDEK (1993) entwickeln sich die Mykoplasmen neben rundlichen oder leicht ovalen Formen zu Fadenformen, sogenannten Filamenten, mit kettenförmig aufeinanderfolgenden kokkoiden Formen und myzelartigen Verzweigungen. RAZIN (1981) gibt die Länge dieser Filamente mit ca. 100 µm und deren Dicke mit ca. 0,4 µm an. Die nur auf Spezialnährböden wachsenden extrem kleinen Kolonien von 0,1 - 0,6 mm Durchmesser besitzen ein Spiegelei-artiges Aussehen, welches sich aufgrund eines biphasischen Wachstumes ergibt. An der Peripherie der Kolonie ist eine flache, durchsichtige Zone erkennbar; im Zentrum befindet sich eine opake, granulierte Zone mit kegelförmigem Wachstum in die Tiefe des Mediums (GEDEK, 1993). MASOVER und HAYFLICK (1985) geben für die zirkuläre doppelsträngige DNS der kleinsten freilebenden Organismen ein Genomgröße von  $4,5 \times 10^8$  Dalton an, welche ausreicht, um circa 600 Proteine zu kodieren. RAZIN (1992) schreibt den meisten Vertretern dieser Familie eine Genomgröße zwischen 500-800 kbp zu.



#### **2.1.1.4 Wirts- und Organtropismus**

Nach GYLSTORFF (1985) sind Mykoplasmen-bedingte Krankheiten meist durch lange Inkubationszeiten, große Latenzperioden, unterschiedliche beteiligte Organsysteme und chronischen Verlauf charakterisiert. Entscheidendes Merkmal der Mykoplasmeninfektion ist die Tatsache, daß sie in einem Organismus persistieren können, ohne Krankheitssymptome auszulösen. Häufig kommt es bei der Infektion mit Mykoplasmen erst durch das gemeinsame Agieren mit anderen Mikroorganismen und Umweltfaktoren in Kombination mit genetischen Eigenschaften und Immunreaktionen des Wirtes zum Krankheitsausbruch (GYLSTORFF, 1985). Viele Jahre lang wurden die Mykoplasmen als strikt wirtsspezifisch angesehen (SABIN, 1941a; 1941b). Obwohl diese Wirtsspezifität für viele Mykoplasmen weiterhin zutrifft, wurde in den letzten Jahren eine steigende Anzahl an Spezies festgestellt, welche unterschiedliche Wirtsspezies besiedeln und dabei krankheitsauslösende Wirkung zeigen können (FREUNDT, 1985). Laut GYLSTORFF (1985) finden sich Mykoplasmen auch auf den Epithelien der Mammae, des Digestionstraktes und den Konjunktiven. Ein Teil von ihnen verfügt über die Möglichkeit, in die Blutbahn und andere Gewebe einzudringen und somit systemische Reaktionen mit Ansiedelung in affinen Organen wie z.B. Gehirn oder Gelenken auszulösen (GYLSTORFF, 1985). Je nach Wirtsspezies und Zelltyp variierende Rezeptoren auf der Seite der Wirtszelle und spezifische Bindungsstellen auf der Mykoplasmenmembran bedingen die unterschiedliche Affinität der Mykoplasmen (GYLSTORFF, 1985).

Nach GYLSTORFF (1985) ist die Adhäsion an die Zelloberfläche Voraussetzung für Pathogenität und Virulenz der Mykoplasmen, wobei eine Zytadsorption meist an Schleimhautepithelien von Trachea, Bronchien, Urogenitaltrakt oder Mamma stattfindet. Nach Anheftung der Mykoplasmen kommt es zur Hemmung der Zilienaktivität am Wimpernepithel und zur Zerstörung der Epithelzellen, welche bis zur Zellyse und anschließenden Abstoßung mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen kann (GYLSTORFF, 1985). Die Schädigung der Wirtszellmembran durch Toxine, Radikale und andere Stoffwechselprodukte der Mykoplasmen werden von RAZIN et al. (1998) aufgeführt.

#### **2.1.1.5 Pathogenität und Erkrankungen bei den einzelnen Tierarten**

Die Pathogenität der Mykoplasmen ist sehr unterschiedlich. So können manche isolierte Mykoplasmenarten als primäre Krankheitserreger eingestuft werden, andere wiederum sind nur Sekundärerreger oder Begleitkeime bei verschiedenen Erkrankungen oder gelten sogar als apathogen (GEDEK, 1993). Mykoplasmen stehen in einer engen Wechselbeziehung mit dem Immunsystem ihres Wirtes. RAZIN (1981) hat keinen Zweifel daran, daß die humorale und zelluläre Immunität und die daraus resultierenden Reaktionen des Wirtes eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen. Ebenso kann laut RAZIN et al. (1998) die Infektion mit Mykoplasmen eine Unterdrückung des Immunsystems des Wirtes zur Folge haben und damit Sekundärinfektionen Vorschub leisten. Nach SELBITZ (2002) lassen sich Mykoplasmen bei Rindern, Schafen, Ziegen und Schweinen im Zusammenhang mit schweren

---

Lungenaffektionen, Pleuritiden, Mastitiden, Aborten, Genitalerkrankungen, Nachgeburtsverhaltungen und Polyarthritiden nachweisen. Neben Keratokonjunktivitiden der Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer wie Gemse und Steinböcke, können Mykoplasmeninfektionen auch bei weiteren Säugetierarten nachgewiesen werden. Bei Pferd, Hund, Katze, Maus, Meerschweinchen oder Ratte erfolgt der Nachweis an den unterschiedlichsten Lokalisationen. Dort führen die Mykoplasmen zum Teil zu schweren Erkrankungen der entsprechenden Organe (SIMECKA et al., 1992; SELBITZ, 2002). Beim Geflügel kommt es v.a. zu hochgradigen Erkrankungen des Respirationstraktes und des Bewegungsapparates durch Mykoplasmen. Hierbei sind neben den oberen Luftwegen (inklusive der Stirnhöhlen) und den Lungen v.a. die Luftsäcke, die Gelenke, die Sehnenscheiden und des weiteren der Urogenitaltrakt betroffen. Neben der aerogenen Aufnahme spielt beim Vogel laut KLEVEN (1997) v.a. eine Übertragung durch infizierte Bruteier eine besonders entscheidende Rolle. Zunehmend werden auch bei Wildvögeln durch Mykoplasmen ausgelöste Erkrankungen nachgewiesen (GOLDBERG et al., 1995; FORSYTH et al., 1996; LEY et al., 1996; SAMUEL et al., 1996; HARTUP et al., 2001). Beim Menschen erwähnt SELBITZ (2002) als wichtigste durch Mykoplasmen ausgelöste Erkrankung die atypische Pneumonie oder sogenannte Eaton-Krankheit. KRAUSE und TAYLOR-ROBINSON (1992) und TULLY et al. (1983) sprechen zusätzlich eine Infektion des Urogenitaltraktes durch Mykoplasmen beim Menschen an.

### 2.1.1.6 Diagnostik

Nach SIMECKA et al. (1992) kann man zunächst grundsätzlich zwei Kategorien in der Diagnostik der Mykoplasmen unterscheiden: Isolation und Identifikation von Mykoplasmen aus erkranktem Gewebe und serologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern. Nach SELBITZ (2002) sind aufgrund des langsamen Wachstumes der Mykoplasmenkolonien der Zusatz von Hemmstoffen zur Unterdrückung anderer Bakterien und besondere Nährmedien mit Pferdeserum oder Hefeextrakten erforderlich. Das sogenannte SP-4 Kulturmedium, welches ursprünglich für Mykoplasmen der Pflanzen und Insekten entwickelt wurde, besitzt nach TULLY (1983) ausgezeichnete Anzuchtqualitäten bei den Mykoplasmen der Säugetiere. Laut SELBITZ (2002) hat sich neben der Verwendung von SP4-Medien eine Inkubation des Untersuchungsmaterials in flüssigen Nährmedien vor Ausstrich auf entsprechende SP4-Spezialagar bewährt. Auch Sterol, welches häufig direkt in die Zellmembran eingebaut wird, wird bei der Anzüchtung von Mykoplasmen benötigt (MASOVER und HAYFLICK, 1985). RAZIN (1981) gibt Glukose oder andere Kohlenhydratmetabolite als weiteren notwendigen Nährmedienbestandteil zur Bereitstellung der benötigten Energie bei vielen Mykoplasmenspezies an. Einigen Mykoplasmenspezies schreibt TAYLOR-ROBINSON ein besseres Wachstum unter anaeroben Konditionen zu (TAYLOR-ROBINSON, 1995).

Laut RAZIN (1981) läßt die GIEMSA-Färbung die Mykoplasmen deutlicher in Erscheinung treten als die Färbung nach Gram. Histologische Veränderungen

betroffener Gewebe sind nicht immer vorhanden und verlangen ein geschultes Auge des Untersuchers (SIMECKA et al., 1992). Immunofluoreszenztests oder Immunoperoxidasetests im Gewebe sind möglich, aber häufig falsch negativ (SIMECKA et al., 1992). Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen werden in der Mykoplasmandiagnostik angewandt, sind für den Einsatz in der Routineuntersuchung allerdings meist zu aufwendig (RAZIN, 1981). Eine endgültige Speziesdiagnose erfolgt laut SELBITZ (2002) vornehmlich durch serologische Verfahren. SIMECKA et al. (1992) sehen die Einordnung der Erreger als tatsächliche Krankheitsauslöser und die Entscheidung, ob das Auffinden von Antikörpern im direkten Zusammenhang mit der Erkrankung steht, als äußerst schwierig an. Die Autoren beschreiben die Kultivierung als obligatorisch zur Bestätigung anderer Methoden, aber als ungeeignet in der Reihenuntersuchung (SIMECKA et al., 1992).

KENNY (1992) erwähnt unter anderem den metabolischen Hemmungstest, die Komplementbindungsreaktion, die indirekte Immunofluoreszenz, den ELISA und den Western Blot als mögliche serologische Diagnostikverfahren (KENNY, 1992). SIMECKA et al. (1992) sehen den ELISA als besten serologischen Test zur Reihenuntersuchung größerer Bestände an, führen aber auch die dafür notwendige Immunkompetenz der untersuchten Tiere als Nachteil an.

SELBITZ (2002) erwähnt die Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Immunoblotting im Zuge der Mykoplasmencharakterisierung. Zunehmend wird auch die Polymerasekettenreaktion zur Identifizierung eingesetzt (SELBITZ, 2002). SIMECKA et al. (1992) erwähnen die hohe Sensitivität der

Polymerasekettenreaktion mit speziellen Primern im Vergleich zu anderen Diagnosemöglichkeiten.

#### **2.1.1.7 Therapie und Prophylaxe**

Laut GEDEK (1993) reagieren Mykoplasmen äußerst sensibel gegenüber oberflächenaktiven Stoffen und lipolytischen Agenzien. Der Einsatz von Fluorchinolonen, Tylosin, Valnemulin, Tiamulin, Tetracyclin, Erythromycin, Streptomycin, Lincomycin, Gentamicin und Rifamycin hat sich bei der Behandlung der Mykoplasmeninfektionen bei Tieren bewährt (SELBITZ, 2002). ROBERTS (1992) erwähnt neben der aufgrund des Fehlens einer echten Zellwand bestehenden Resistenz gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen die wachsende Widerstandsfähigkeit gegenüber der Behandlung mit einigen zunächst effektiven Antibiotika aufgrund auftretender Mutationen. Den Einsatz von Chinolonen bei der Behandlung der Mykoplasmeninfektion bei Mensch und Tier bezeichnet ROBERTS (1992) als die Methode der Wahl.

Für den Menschen ist laut ELLISON et al. (1992) noch keine effektive und sichere Vakzine entwickelt worden. Die Notwendigkeit einer Schluckimpfung begründen ELLISON et al. mit der hohen Prävalenz der Mykoplasmeninfektion, dem langwierigen Verlauf einer Infektion und dem Scheitern der Antibiotika und anderer Therapeutika, die Mykoplasmen zu vernichten und den infektiösen Krankheitsprozeß zu stoppen (ELLISON et al., 1992). Laut SELBITZ (2002) gelangen zur Prophylaxe einiger Mykoplasmeninfektionen jedoch bei Rindern, Schweinen, Schafen, Ziegen und Geflügel meist Impfstoffe aus inaktivierten Mykoplasmen zum Einsatz und erzielen gewisse Erfolge. Impfstoffe allein

ersetzen aber nicht die Optimierung der Haltungsbedingungen und können auch nicht das Auftreten von Sekundärinfektionen verhindern (SELBITZ, 2002).

### **2.1.2 Mykoplasmen bei Reptilien**

Im Gegensatz zu den bereits oben erwähnten Tieren wie Säugetier und Vogel spielten Mykoplasmen im Zusammenhang mit Erkrankungen bei Reptilien bis vor wenigen Jahren in der Literatur keine oder nur eine untergeordnete Rolle. BROWN (2002) vermutet allerdings, daß Mykoplasmeninfektionen der Fische und später auch der Reptilien und Amphibien bereits vor 400 Millionen Jahren auftraten.

#### **2.1.2.1 Mykoplasmen bei Schlangen, Krokodilen und Alligatoren**

PENNER et al. (1997) bringen eine proliferative Tracheitis und Pneumonie eines Burma-Python (*Python molurus bivittatus*) mit einer bisher unbeschriebenen Mykoplasmenspezies in Verbindung. Eine Mykoplasmen-assoziierte Polyarthrititis bei juvenilen in Gefangenschaft gehaltenen Krokodilen (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe beschreiben MOHAN et al. (1995). Hierbei wird der Ausbruch der Erkrankung durch eine hohe Morbidität und eine geringe Mortalität gekennzeichnet. Der Versuch einer Vakzinierung dieser Krokodile wird ein Jahr darauf von MOHAN et al. beschrieben (MOHAN et al., 1996). Die bei dieser Epizootie aus Gelenken und Lungen der infizierten Krokodile isolierten Mykoplasmen werden von KIRCHHOFF et al. (1997) als bisher unbekannte Spezies bestimmt und erhalten den Namen *Mycoplasma crocodyli* sp. nov.

Eine mit unterschiedlichen Mykoplasmenspezies assoziierte systemische Krankheit bei in Gefangenschaft gehaltenen Alligatoren (*Alligator mississippiensis*) trat erstmals 1995 in Florida auf. Diese Erkrankung ist durch eine hohe Mortalitätsrate von bis zu 70 % und einer ausgedehnten Verbreitung des infektiösen Agens in den Geweben der infizierten Tiere gekennzeichnet (BROWN et al., 1996; BROWN et al., 1997). Weitere Untersuchungen dieser Erkrankung werden in den darauffolgenden Jahren von CLIPPINGER et al. (1996; 2000), HELMICK et al. (1997) und BROWN et al. (2001b) vorgenommen. BROWN et al. schlagen 2001 als Namen dieser neuen Mykoplasmenspezies nach deren Charakterisierung *Mycoplasma alligatoris* sp. nov. vor (BROWN et al., 2001a).

#### **2.1.2.2 Mykoplasmeninfektionen der Schildkröten**

##### **2.1.2.2.1 Eigenschaften der bisher aus Schildkröten gewonnenen *Mycoplasma*-Isolate**

Bisher wurden drei aus Schildkröten isolierte Mykoplasmenspezies genauer charakterisiert: *Mycoplasma testudinis*, isoliert aus der Kloake, aber nicht aus dem Nasopharynx einer klinisch vollkommen unauffälligen *Testudo graeca* in England (HILL, 1985); *Mycoplasma agassizii* wurde aus dem oberen Respirationstrakt an URTD erkrankter *Gopherus agassizii* und *Gopherus polyphemus* isoliert (BROWN et al., 1994; BROWN et al., 1995). Ein bisher nicht genauer benanntes Isolat, „Mycoplasma H3110“, stammt aus einer *Gopherus agassizii* (BROWN et al., 1994; BROWN et al., 1995). Ebenso gelingt BROWN et al. (1995) die Isolation von *Acholeplasma laidlawii*, einem vermutlich



nicht pathogenen Kommensalen aus der Nase einer moribunden *Gopherus polyphemus*. BROWN et al. (1995) vergleichen die drei bei Landschildkröten gefundenen Mykoplasmen an Hand der Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens mit bereits klassifizierten Mykoplasmen spezie und plazieren daraufhin alle drei erwähnten Mykoplasmen isolate in die phylogenetische Gruppe *Mycoplasma hominis*. Aufgrund ihrer Basensequenz wird *Mycoplasma testudinis* hierbei der Untergruppe *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma agassizii* der Untergruppe *Mycoplasma hyorhinis* und *Mycoplasma* H3110 der Untergruppe *Mycoplasma fermentans* zugeordnet (BROWN et al., 1995). Während HILL (1985) bei *Mycoplasma testudinis* nur das Isolat 01008<sup>T</sup> erwähnt, werden bei *Mycoplasma agassizii* verschiedene Isolate beschrieben: PS6, Utah, 723 und K120 (SCHUMACHER et al., 1992; BROWN et al., 1995; ADAMS et al., 1996; MCLAUGHLIN et al., 1996a; SCHUMACHER et al., 1996; BROWN et al., 1998; BROWN et al., 1999c; BROWN et al., 2001c; JACOBSON et al., 2003 - in press). BROWN et al. publizieren 2001 Ergebnisse über weitere Isolate: PS10, 553 und 111 aus der Nase an URTD erkrankter *Gopherus agassizii*, PS13T aus der Trachea und PS13C aus den Choanen einer weiteren Schildkröte mit URTD (BROWN et al., 2001c). Die auch bei anderen Tierarten wie Nagetieren und Geflügel bekannte Variabilität der Isolate bezüglich ihrer Virulenz (SIMECKA et al., 1992) trifft laut JACOBSON et al. (2003 - in press) auch bei den Erregern der URTD der Schildkröte zu. Daher vermuten JACOBSON et al. (2003 - in press) eine unterschiedliche infektiöse Dosis der verschiedenen Mykoplasmen isolate. MCLAUGHLIN et al. (1996a) und BROWN et al. (1999c) geben die infektiöse Dosis für *Mycoplasma agassizii* 723 nach intranasaler

Inokulation bei der URTD der Gopherschildkröte mit weniger als 10 Kolonie bildenden Einheiten (CFU= Colony forming units) an. Alle Autoren beschreiben sowohl die klinischen Erscheinungen als auch die histopathologischen Veränderungen als dosisunabhängig, nachdem  $10^1$ ,  $10^3$  und  $10^5$  CFU intranasal instilliert wurden (MCLAUGHLIN et al., 1996a; BROWN et al., 1999c). Nach MCLAUGHLIN et al. (1996a) mögen andere Mykoplasmenisolate variierende Dosis-Wirkungsbeziehungen aufweisen. Laut SCHUMACHER et al. (1996), BROWN et al. (1999c) und JACOBSON et al. (2003 - in press) gibt es Hinweise darauf, daß einige neuerdings gefundene Mykoplasmenspezies selbst in sehr hohen Dosierungen keine klinische Erkrankung auslösen. Somit kommt der genauen Bestimmung der am Krankheitsgeschehen beteiligten Mykoplasmen zunehmend Bedeutung zu.

#### 2.1.2.2.2 Klinik und Pathologie

Einen Überblick der bislang bei Landschildkröten bekannten Mykoplasmen und der v. a. durch diese Erreger ausgelösten Erkrankungen gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Mit Mykoplasmen assoziierte Erkrankungen der Landschildkröten

Autoren/Jahr	Spezies	Mykoplasmen	Symptom	Übertrag	Land	Sek.infektionen
Hill, 1985	TG	Myc.testudinis (01008)	klinisch gesund	k.A.	GB	k.A.
Jacobson / Gaskin, 1990	GoAg	Mycoplasma	URTD	k.A.	USA	virus negativ; div. Bakter., grampos/neg, Pasteur. testudinis
Rosskopf, 1990	GoAg	Mycoplasma	URTD	v.a. Neuzugänge	USA	Blut/ Endoparasiten; Pasteur.spp.
Jacobson et al., 1991	GoAg	Mycoplasma	URTD	k.A.	USA	div. Bakter., Pasteur. testudinis
Jacobson et al., 1991	GoAg, GC, GePard, div.	Mycoplasma	URTD (URT, nicht LRT)	ja (Auswild)	USA	virus/Chlamydien neg; div. Bakter., Pasteur.testudinis

Autoren/Jahr	Spezies	Mykoplasmen	Symptom	Übertrag	Land	Sek.infektionen
Schumacher, 1992	GoAg	Myc.agassizii, (PS6 neu)	URTD	k.A.	USA, Mexiko	div. Bakter.; Virenbeteiligung?
Jacobson, 1992	GoAg, GoPo, div.	Mycoplasma	URTD	ja (Auswild)	USA, GB, Eur	div. Bakter., Pasteur. testudinis
Schumacher, 1993	GoAg	Myc.agassizii prop.spp.nov.	URTD	in Inocul	USA	k.A.
Brown M. et al., 1994	GoAg	Myc.agassizii spp.nov, Myc.testudinis	URTD	Kontakt, in Inocul	USA	Pasteur.spp. (Synergismus)
Brown D. et al., 1995	GoAg, GoPo	Myc.agassizii, (PS6, H3110), Myc.testudinis, Achol.laidlawii	URTD	k.A.	USA	k.A.
Jacobson et al., 1995	GoAg	Myc.agassizii	URTD	ja (Auswild)	USA	Pasteur. testudinis (Synergismus)
Adams/Jacobson 1995	GoAg, GoPo	Myc.agassizii	URTD	k.A.	USA	k.A.
Adams et al., 1996	GoAg, GoPo	Myc.agassizii (PS6, Utah)	URTD	in vitro	USA	k.A.
Schumacher et al., 1996	GoAg, GoPo	Myc.agassizii (H3110 u.a.)	URTD	horizo + vertical -	USA	k.A.
McLaughlin et al., 1996	GoAg	Myc.agassizii	URTD	horizo + vertical -	USA	k.A.
McLaughlin et al., 1996	GoAg	Myc.agassizii (723)	URTD	in Inocul	USA	k.A.
Lederle et al., 1997	GoAg	Myc.agassizii	minimal, nur NA	k.A.	USA	k.A.
Schumacher et al., 1997	GoAg	Myc.agassizii	URTD	k.A.	USA	k.A.
McLaughlin, 1997	GoPo	Myc.agassizii	URTD	in Inocul horizo+ vert- pen-	USA	virus negativ; div. Bakter., v.a.gramneg, Pasteur. testudinis
Brown D. et al., 1998	TG	Myc.agassizii (PS6, Utah C, neu: K 120 )	URTD	k.A.	Frankr.	k.A.
Homer et al., 1998	GoAg	Mycoplasma	URTD	k.A.	USA	div. Bakter., Funguspneumonie
Schumacher et al., 1999	GoAg	Myc.agassizii	URTD	IgG via Ei	USA	k.A.
Brown M. et al., 1999	GoAg, Go Po, div.	Myc.agassizii (Stamm 723)	URTD; tgl. Variation	in Inocul	USA	k.A.
Brown M. et al., 1999	GoAg	Myc.agassizii	URTD zyklisch	k.A.	USA	virale Agentien, div. Bakter. vermutet
McLaughlin et al., 2000	GoPo	Myc.agassizii	URTD Hämorrr	k.A.	USA	virus negativ; div. Bakter.,v.a.gramneg, Pasteur. testudinis
Dickinson et al., 2001	GoAg	Mycoplasma	URTD	k.A.	USA	div. Bakter., Pasteur. testudinis

Autoren/Jahr	Spezies	Mykoplasmen	Symptom	Übertrag	Land	Sek.infektionen
Brown M. et al., 2001	GoAg, Go Po, div.	Myc.testudinis, Myc.agassizii prop.spp.nov. (PS6); Stamm PS10,553,111, PS13T,PS13C	URTD / klinisch gesund	k.A.	USA	k.A.
Jacobson et al., 2003	GoAg, GoPo	Myc.agassizii (PS6,H3110, 723)	URTD	horizo + vertical -	USA	div. Bakter., Pasteur. spp.

Spezies: GePard = *Geochelone pardalis*; GoAg = *Gopherus agassizii*; GoPo = *Gopherus polyphemus*; TG = *Testudo graeca*;

weitere Abkürzungen: Achol = *Acholeplasma*; Auswild = Auswilderung ehemaliger in Gefangenschaft gehaltener Landschildkröten; Bakt = Bakterien; div = diverse Schildkrötenspezies; Eur = Europa; Frankr = Frankreich; grampos = grampositive Bakterien; gramneg = gramnegative Bakterien; Hämor = subdermale Hämorrhagien unter den Hornschildern des Plastron; horizo + = horizontale Übertragung; horizo - = keine horizontale Übertragung; in Inocul = intranasale Inokulation; in vitro = außerhalb des lebenden Organismus; k.A. = keine Angaben; LRT = Lower respiratory tract; Myc = *Mycoplasma*; NA = Nasenausfluß; neg = negativ; nov = novum; Pasteur = *Pasteurella*; pen - = keine Übertragung via Gehege; Sek.infektion = Sekundärinfektionen; spp. = Species; tgl = täglich; Übertrag = Übertragung; URT = Upper respiratory tract; URTD = Upper respiratory tract disease; vert - = keine vertikale Übertragung.

Seit den siebziger Jahren findet eine bei freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Wüstenschildkröten (*Gopherus polyphemus*) in Amerika auftretende Erkrankung der Atemwege Erwähnung (FOWLER, 1977a,b; ROSSKOPF et al., 1981). JACOBSON und GASKIN stellen 1990 diese Erkrankung der oberen Atemwege der Wüstenschildkröten unter dem Begriff der sogenannten „Upper Respiratory Tract Disease“ (URTD) vor. ROSSKOPF (1990) berichtet im selben Jahr vom „Upper Respiratory Syndrome“ bei in Gefangenschaft gehaltenen Wüstenschildkröten in Form einer rezidivierenden, nahezu therapieresistenten Rhinitis mit möglicher Todesfolge. Zusätzlich beschreibt ROSSKOPF (1990) das Auftreten von Entzündungen und nekrotischen Belägen in der Maulhöhle schwer erkrankter Tiere. Auch in Europa findet diese Erkrankung der oberen

Atemwege Erwähnung. So berichtet BONIN (1992) von der Rhinitis als dem am häufigsten auftretenden Krankheitsbild der Landschildkröten (v.a. *Testudo graeca* und *Testudo hermanni*) in Frankreich. In England kann ebenfalls eine mit Nasenausfluß einhergehende Erkrankung bei Griechischen und Maurischen Landschildkröten beobachtet werden (LAWRENCE und NEEDHAM, 1985). Klinisch äußert sich die Infektion mit Mykoplasmen bei betroffenen Landschildkröten durch serösen, mukösen oder purulenten Nasenausfluß und Augenausfluß, Konjunktivitis und Lidödem (SCHUMACHER et al., 1992; BROWN et al., 1994; MCLAUGHLIN et al., 2000; JACOBSON et al., 2003 - in press). MCLAUGHLIN (1997) und BROWN et al. (1999c) nehmen eine Einteilung der klinischen Symptome der URTD in vier Stadien vor. Nasenausfluß, Augenausfluß, Konjunktivitis und Lidödem werden hierbei mit keinen, minimalen, milden und schweren Symptomen auf einer Skala von 0 - 3 beurteilt (MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1999c). Im Zuge einer Infektionsstudie kann MCLAUGHLIN (1997) aufzeigen, daß frisch geschlüpfte Gopherschildkröten bald nach der Infektion mit Mykoplasmen besonders starke Symptome der URTD zeigen. Persistent infizierte adulte Tiere weisen laut SCHUMACHER et al. (1997) intermittierende klinische Symptome auf. LEDERLE et al. (1997) können bei freilebenden Wüstenschildkröten in Nevada lediglich einen geringgradigen Nasenausfluß feststellen, alle weiteren Symptome werden bei keinem der klinisch untersuchten Tiere bemerkt. HOMER et al. (1998) berichten von eingesunkenen Augäpfeln bei freilebenden Wüstenschildkröten in Kalifornien. MCLAUGHLIN et al. (2000) erwähnen petechiale und ekchymotische Blutungen unter den Hautschuppen und

Plastronschildern bei an URTD erkrankten Gopherschildkröten. Die URTD führt eventuell zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion. JACOBSON et al. (1991b) berichten von einer Erhöhung der Harnstoff- und Harnsäurewerte im Serum von an URTD erkrankten freilebenden Wüstenschildkröten. Hierbei vermuten die Autoren eine allgemeine Dehydratation und Mangelernährung der erkrankten Tiere als Hauptursache der erhöhten Nierenwerte, schließen aber die Möglichkeit einer zusätzlich bestehenden Nierenerkrankung nicht explizit aus. Für eine eventuelle Nierenbeteiligung am Krankheitsgeschehen spricht auch der von MCLAUGHLIN et al. (2000) bei der Sektion an URTD erkrankter Gopherschildkröten geführte Nachweis von Hämosiderinablagerungen in der Niere. BROWN et al. (1999b) beschreiben in einer vierjährigen Studie bei *Gopherus agassizii* einen zyklischen Verlauf der Symptome. Klinische Symptome der URTD können laut BROWN et al. (1999c) sogar tägliche Variationen aufweisen. Andere Autoren berichten von mit Mykoplasmen infizierten Schildkröten, die zunächst keine klinisch eindeutigen Symptome der URTD zeigen (SCHUMACHER et al., 1996; SCHUMACHER et al., 1997; BROWN et al., 1999b; MCLAUGHLIN et al., 2000).

Da bei der mikrobiologischen Untersuchung der Nasenabstriche selten eine Isolation pathogener Bakterien gelingt, vermuten einige Untersucher zunächst eine virale Ursache der Rhinitis bei der Landschildkröte (JACKSON und NEEDHAM, 1983). Obwohl der Nachweis der Mykoplasmen im Zusammenhang mit dieser Erkrankung zunächst nicht erfolgt, vermuten LAWRENCE und NEEDHAM (1985) bereits 1985 eine Mykoplasmeninfektion als mögliche Ursache der Rhinitis der Landschildkröte. In Amerika gelingt JACOBSON et al.

1991 der elektronenmikroskopische Nachweis von Mykoplasmen in der Nasenhöhle einer an URTD erkrankten wildlebenden Wüstenschildkröte (JACOBSON und GASKIN, 1990; JACOBSON, 1991; JACOBSON et al., 1991b).

Zusätzlich erfolgt eine Isolation der Mykoplasmen bei Wüstenschildkröten (*Gopherus agassizii*), einer Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) und einer Pantherschildkröte (*Geochelone pardalis*) (JACOBSON et al., 1991b). JACOBSON et al. (1991b; 1992) berichten bei vielen weiteren Landschildkrötenarten wie *Geochelone elegans* (indische Sternschildkröte), *Chelonoidis carbonaria* (Köhlerschildkröte), *Astrochelys radiata* (Strahlenschildkröte) und *Gopherus polyphemus* (Gopherschildkröte) in Amerika vom Auftreten der URTD. BROWN et al. beschreiben 1995 erstmals die gesicherte Isolation von Mykoplasmen aus der Nasenspülprobe einer Gopherschildkröte (*Gopherus polyphemus*) in Amerika (BROWN et al., 1995). BROWN et al. (2001c) beschreiben den Nachweis von Mykoplasmen bei diversen weiteren wildlebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Landschildkröten, u.a. bei *Chelonoidis chilensis* (Argentinische Landschildkröte), *Indotestudo forstenii* (Celebes-Landschildkröte), *Geochelone sulcata* (Spornschildkröte), *Terrapene carolina* (Carolina-Dosenschildkröte) und *Testudo graeca* (Maurische Landschildkröte) aus dem oberen Respirationstrakt. Bei vielen der erwähnten Schildkrötenspezies ist allerdings das pathogenetische Potential der Mykoplasmen noch nicht vollständig geklärt (BROWN et al., 2001c). HILL (1985) beschreibt im Jahre 1985 die Isolation von Mykoplasmen aus der Kloake einer in England als Haustier gehaltenen

Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*). Hierbei handelt es sich um ein klinisch vollkommen gesundes Tier.

Bei der Sektion freilebender *Gopherus agassizii* können JACOBSON et al. (1991b) nach longitudinaler und transversaler Spaltung des Kopfes an URTD erkrankter Tiere große Mengen an Exsudat in der Nasenhöhle und den Nasengängen nachweisen. Das zum Teil die Nasengänge vollständig ausfüllende Exsudat besteht vor allem aus Zellüberresten und Heterophilen. Mikroskopische Untersuchungen zeigen einen diffusen Verlust muköser Drüsen. Glanduläre Drüsen werden ersetzt oder angefüllt mit proliferierenden Epithelzellen. Lymphozyten- und Histiozyteninfiltrate verdecken in stark betroffenen Bereichen das Schleimhautepithel und dringen tief in die Lamina propria ein. In den Bereichen der olfaktorischen Schleimhaut erscheint das normale mehrschichtige Arrangement der Epithelzellen durch proliferierende, undifferenzierte Zellen mit Infiltration von Heterophilen, Lymphozyten und Histiozyten ersetzt. In entzündeten Bereichen des mukösen Epithels bemerken JACOBSON et al. sowohl das Zugrundegehen der Zilien, als auch Atrophie und Verlust der Becherzellen. In mukösen und olfaktorischen Schleimhautbereichen findet eine Schwellung und Vakuolenbildung des Epithels mit Lockerung des Zellzusammenhaltes statt, und es kommt zu einem Ersatz des ehemals existierenden Epithels durch undifferenzierte Zellen. Bei einigen Tieren können Zellnekrose, Erosionen und Ulzerationen in der mukösen Schleimhaut festgestellt werden. Wieder andere an URTD erkrankte Schildkröten zeigen Fibrose, Blutansammlung und Ödeme in der Lamina propria. Fokale Proliferation des Tracheal- und Bronchienepithels sowie Granulome der Lunge



werden nur bei wenigen *Gopherus agassizii* diagnostiziert. Anzeichen hepatischer Hämosiderose werden bei an URTD erkrankten Tieren häufiger beobachtet (JACOBSON et al., 1991b). Eine Einlagerung von Eisen in Hepatozyten und Kupffer'sche Sternzellen weisen auch Gopherschildkröten mit URTD auf (MCLAUGHLIN et al., 2000). Bei der pathohistologischen Untersuchung an URTD erkrankter *Gopherus polyphemus* beschreiben MCLAUGHLIN et al. (2000) neben den bei Wüstenschildkröten entsprechenden Veränderungen in der Nasenhöhle zusätzlich eine Entzündung und Proliferation des Epithels im Bereich der Glottis und der Trachea, proliferative Lungenentzündung und Proliferation der Kolonschleimhaut. In einer weiteren Untersuchung an URTD erkrankter Gopherschildkröten stellt MCLAUGHLIN (1997) regelmäßig Veränderungen der Lunge in Form epithelialer Zellhyperplasie und lymphoider Aggregate im Lungeninterstitium fest.

Bei der URTD der Gopherschildkröte nehmen JACOBSON et al. (1995) eine Klassifikation der entstehenden Läsionen der Nasenhöhle vor, um die pathohistologischen Veränderungen so objektiv wie möglich zu beurteilen. Eine Einteilung in die vier Stadien normal, milde, mäßige und schwere Entzündung wird aufgrund des Auftretens subepithelialer lymphoider Aggregate, der Menge vorkommender Lymphozyten, Heterophiler und Plasmazellen in der Lamina propria, Ödeme in der Lamina propria und aufgrund des Ausmaßes der Proliferation epithelialer Basalzellen vorgenommen. MCLAUGHLIN (1997) und MCLAUGHLIN et al. (2000) nehmen eine ebensolche Einteilung der Entzündungsstadien vor. MCLAUGHLIN (1997) und auch BROWN et al.

(1999c) differenzieren diese Läsionen feiner auf einer Skala von 0 - 5, um eine noch genauere Einteilung vornehmen zu können.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Nasenhöhle erkrankter Wüstenschildkröten enthüllen bei JACOBSON et al. (1991b) zahlreiche pleomorphe Organismen auf der Zelloberfläche, welche zum Teil Ketten bilden. Die Fotos der mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersuchten Nasenhöhle zeigt die circa 350 - 900 nm großen, zellwandlosen Organismen in enger Verbindung zu den Oberflächenepithelien. Aufgrund dieser Charakteristika ordnen die Autoren diese Organismen den Mykoplasmen zu. Auch bei an URTD erkrankten Gopherschildkröten werden mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie *Mycoplasma spp.* in engem Kontakt mit Zellmembranen der Nasenschleimhaut nachgewiesen (MCLAUGHLIN et al., 2000). Elektronenmikroskopische Studien im Zuge der Charakterisierung von *Mycoplasma agassizii*-Isolaten zeigen kokkoide bis pleomorphe Zellen in einer Größe von 350-900 nm (BROWN et al., 2001c). Die Mykoplasmen besitzen eine dreischichtige Membran. Im Dunkelfeldmikroskop weisen in SP4-Nährbouillon gezüchtete Isolate laut BROWN et al. (2001c) meist rundliche, nicht helikale, unbewegliche Zellformen auf.

#### **2.1.2.2.3 Übertragungswege**

In experimentellen Übertragungsstudien zeigt sich, daß die Zeit zwischen der Infektion und dem Einsetzen der ersten klinischen Symptome mindestens zwei Wochen beträgt (SCHUMACHER et al., 1996; MCLAUGHLIN, 1997; JACOBSON et al., 2003 - in press). BROWN et al. (1999c) beobachteten

klinische Symptome 4-8 Wochen nach Infektion mit Mykoplasmen. MCLAUGHLIN (1997) berichtet von einigen Gopherschildkröten, die erst 16 Wochen post infectionem eindeutige klinische Symptome zeigen.

Nach den Erfahrungen von ROSSKOPF (1990) erfolgt die Infektion häufig durch Aufnahme eines Neuzuganges, der ohne vorherige Quarantäne in den Schildkrötenbestand gesetzt wird und häufig als klinisch inapparenter Träger die Erkrankung in eine zuvor gesunde Gruppe schleppt (ROSSKOPF, 1990). Von ähnlichen Beobachtungen berichten LAWRENCE UND NEEDHAM (1985) und BONIN (1992) in England und Frankreich. MCLAUGHLIN (1997) und MCLAUGHLIN et al. (1996b) belegen anhand durchgeführter Transmissionsstudien eine horizontale Übertragung bei Gopherschildkröten, eine vertikale Übertragung wird aufgrund der Untersuchungen nahezu ausgeschlossen. Nachkommen mykoplasmeninfizierter Elterntiere entwickeln laut MCLAUGHLIN (1997) keine klinischen Anzeichen einer URTD. Auch kann mit den unterschiedlichen Verfahren in Ei oder Nachzucht keine Infektion mit dem Erreger nachgewiesen werden, wenn die Eier umgehend nach der Ablage aus dem Gehege entfernt wurden (MCLAUGHLIN et al., 1996b; MCLAUGHLIN, 1997). Eine Übertragung durch eine infizierte Umgebung kann von MCLAUGHLIN nicht vollständig ausgeschlossen werden, erscheint jedoch eher unwahrscheinlich. Naive Gopherschildkröten wurden von MCLAUGHLIN in Gehege gesetzt, in denen noch 15 Minuten zuvor Mykoplasmen-infizierte Schildkröten untergebracht waren. Weder entwickelte eine der naiven Schildkröten Symptome, noch konnten bei diesen Tieren Erreger oder Antikörper in den nachfolgenden Untersuchungen nachgewiesen werden

(MCLAUGHLIN, 1997). Inwiefern infizierte Bauten bei der Übertragung der URTD der Gopherschildkröten eine Rolle spielen, ist noch nicht vollständig geklärt (MCLAUGHLIN, 1997). Eine Übertragung durch das gemeinsame Aufsuchen von Wasserstellen infizierter und nicht infizierter Tiere stellt infolge des Trinkverhaltens der Schildkröten einen möglichen Übertragungsweg dar (MCLAUGHLIN, 1997). In derselben Studie untersucht MCLAUGHLIN (1997), ob mit Antikörpern gegen Mykoplasmen ausgestattete Gopherschildkröten gegen eine erneute Infektion geschützt sind. Klinische Erscheinungen treten bei reinfizierten Tieren schneller und vehementer auf. Ebenso wird der Anstieg der Antikörpertiter bei reinfizierten Schildkröten bereits nach 4 Wochen deutlich erkennbar, während bei naiven Tieren ein Titeranstieg erst circa 6 Wochen post infectionem zu bemerken ist (MCLAUGHLIN, 1997). Obwohl diese Untersuchungen auf Gopherschildkröten limitiert sind, erwarten JACOBSON et al. (2003 - in press) gleiche Reaktionen bei anderen mit Mykoplasmen infizierten Schildkröten.

#### 2.1.2.2.4 Diagnostik

Auskunft über die vorgenommenen Nachweismethoden der Mykoplasmen gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Nachweismethoden der Mykoplasmen bei Landschildkröten

Autoren/Jahr	EM	Kult	Iso	Lokal. Isolat	Kultmorph	Iso Abl	MatELISA	Sero	PCR/Restranal
Hill, 1985	ja	ja	ja	Kloake	k.A.	Platten: 2Tage GIEMSA	k.A.	IP	DNA Basen- komposition, G/C- DenTemp
Jacobson / Gaskin, 1990	ja	ja	ja	Nasenhö	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Autoren/Jahr	EM	Kult	Iso	Lokal. Isolat	Kultmorph	Iso Abl	MatELISA	Sero	PCR/Restr. anal
Jacobson et al., 1991	ja	ja	ja	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Jacobson et al., 1991	ja	ja	ja	Nasenspül PBS	k.A.	7-14 Tg Kultur	k.A.	k.A.	k.A.
Schumacher, 1992	ja	k.A.	ja	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	ELISA cut off?	k.A.
Jacobson, 1992	ja	ja	ja	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Schumacher, 1993	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA >2pos	k.A.
Brown M. et al., 1994	k.A.	ja	ja	Nasenspül SP4 Bouillon	k.A.	>3 Wo Iso	Plasma	ELISA >2pos	k.A.
Brown D. et al., 1995	k.A.	ja	ja	Nasenspül	k.A.	>3 Wo Iso	k.A.	k.A.	PCR/ Restr. anal Sequenz
Jacobson et al., 1995	k.A.	k.A.	ja	Nasenhö, cho, tra, ova, vasdef	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA cut off?	k.A.
Adams/ Jacobson, 1995	ja	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Adams et al., 1996	ja	ja	ja	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Schumacher et al., 1996	k.A.	ja	ja	Nasenspül SP4 Bouillon PBS	Spiegelei Maulbeere Blumenkohl	>3 (-6) Wo Iso	Plasma	ELISA >3pos	PCR/ Restr. anal Sequenz
McLaughlin et al.	k.A.	ja	ja	KloakentupEi, CAF	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA	PCR: Tupfer, Ei, CAF, Nasenspül
McLaughlin et al.	k.A.	ja	ja	Nasenspül	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA cut off?	PCR
Lederle et al., 1997	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA >3pos	k.A.
Schumacher et al., 1997	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA >2pos	k.A.
McLaughlin, 1997	Ja	ja	ja	Nasenhö Konjunct Nasenspül SP4 Bouillon	k.A.	>3 (-6) Wo Iso	Plasma Schlüpfling Überstand Eidotter	ELISA >3pos	PCR/ Restr. Analyse
Brown D. et al., 1998	k.A.	ja	ja	Nasenspül	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	PCR/ Restr. anal Sequenz
Homer et al., 1998	k.A.	ja	ja	Choane Nasenhö	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA cut off?	PCR
Schumacher et al., 1999	k.A.	k.A.	k.A.	Nasenspül PBS	k.A.	k.A.	Plasma Schlüpfling Überstand Eidotter	ELISA	PCR/ Restr. Analyse
Brown M. et al., 1999	k.A.	ja	ja	Nasenspül SP4 Bouillon Ca-alg-Tupfer	k.A.	>3 (-6) Wo Iso	Plasma	ELISA >2pos	PCR/ Restr. Analyse

Autoren/Jahr	EM	Kult	Iso	Lokal. Isolat	Kultmorph	Iso Abl	MatELISA	Sero	PCR/Restr. anal
Brown M. et al., 1999	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA >3pos	k.A.
McLaughlin et al., 2000	Ja	ja	ja	Nasenspül SP4 Bouillon Ca-alg-Tupfer	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA >3pos	PCR/ Restr. Analyse
Dickinson et al., 2001	k.A.	ja	k.A.	Nasenspül NaCl	k.A.	k.A.	Plasma	ELISA cut off?	PCR
Brown M. et al., 2001	Ja	ja	ja	Nasenspül SP4 Bouillon Nasenhö tra,choa	zunächst Maulbeere, dann Spiegelei	>3 (-6) Wo Iso	Plasma	k.A.	PCR/ Restr. anal Sequenz
Jacobson et al., 2003	Ja	ja	ja	Nasenspül SP4 Bouillon PBS	Spiegelei Maulbeere Blumenkohl	>3 (-6) Wo Iso	Plasma	ELISA >3pos	PCR/ Restr. anal Sequenz

Abkürzungen: Abl = Ablesung; CAF = Chorionallantois/Amnion Flüssigkeit; Ca-alg-Tupfer = Calcium Alginat Tupfer; cut off? = Titerhöhe zur Trennung zwischen positiver und negativer Probe fraglich; Choa = Choane; Ei= Eischalenmembran; EM = Elektronenmikroskopie; G/C Den Temp = Guanin-Cytosinegehalt der Mykoplasmen-DNS, errechnet aufgrund der Denaturierungstemperatur von 83,5 °C; Iso = Isolat; Kloakentup = bei seropositiven Weibchen während der Eiablage entnommene Kloakentupfer; Kult = Kultur; KultMorph = Kulturmorphologie auf SP4 Agar; Lokal. Isolat = Lokalisation des Isolats; MatELISA = Material des ELISA; NaCl = physiologische Kochsalzlösung; Nasenhö = Nasenhöhle; Nasenspül = Nasenspülung; ova = Ovargewebe; PBS = Phosphat gepufferte Salzlösung; Plasma = Blutplasma; pos = positiv; Restr. anal = Restriktionsenzymanalyse; Sequenz = Sequenzierung; SP4 Bouillon = SP4 Nährbouillon; Tg = Tage; Tra = Trachea; vasdef = Gewebe des Vas deferens (Hoden); Wo = Woche/n.

ADAMS und JACOBSON (1995) und ADAMS et al. (1996) untersuchen in vitro die zytopathogene Wirkung von *Mycoplasma agassizii* auf Trachealring- und Fibroblastenkulturen von Schildkröten. *Mycoplasma agassizii*, Isolat PS6 zeigt eine Bindungspräferenz für Zilienzellen, das Utah-Isolat bindet bevorzugt an Zilien- und sekretorischen Zellen. Obwohl eine hohe Infektionsdosis der Isolate verwendet wird, können keine pathologischen Veränderungen der Zellkulturen festgestellt werden. Nach Meinung der Autoren demonstrieren diese Ergebnisse, daß Läsionen durch Mykoplasmen nicht durch direkte

zytopathogene Effekte, sondern vielmehr durch die wirtseigene Immunantwort bedingt sind (ADAMS et al., 1996). Auch BLAHAK (2000a) vermutet eine Verstärkung der Symptome aufgrund Immunreaktionen bei der Reinfektion der Schildkröte mit Mykoplasmen.

Eine weitere Nachweismethode der Mykoplasmen basiert auf deren Anzüchtung in Spezialmedien. Wie die Mykoplasmen anderer Tiere benötigen die Erreger der Schildkröten-URTD spezifische Zusätze wie Glukose und equines oder fetales Kälberserum (BROWN et al., 1994; SCHUMACHER et al., 1996; BROWN et al., 1999c; BROWN et al., 2001c; JACOBSON et al., 2003 - in press). Besonders gute Ergebnisse lassen sich mit spezifischen SP4-Medien erzielen, wie sie TULLY (1983) bzw. TULLY et al. (1979; 1983) beschreiben. Sowohl Nasenspülungen als auch Gewebeproben von Choanen, Nasengängen, Trachea und Lunge haben sich als zur Kultivierung der Mykoplasmen geeignetes Ausgangsmaterial erwiesen (BROWN et al., 2001c). JACOBSON et al. (1995) isolieren Mykoplasmen am häufigsten aus bei der Sektion entnommenen Abstrichen von Choanen und Nasengängen. Eine Isolation gelingt aber auch aus Trachealabstrichen, Ovarialgewebe und Gewebe des Vas deferens des Hodens von Gopherschildkröten (JACOBSON et al., 1995). MCLAUGHLIN (1997) unternimmt Isolationsversuche aus Eidotter, Albumin, Eischalenmembranen und Chorioallantois-Amnion-Flüssigkeit (CAF). Obwohl Nasenspülungen in einigen Untersuchungen auch mit Kochsalzlösung oder Phosphat gepufferter Lösung durchgeführt werden (JACOBSON et al., 1991b; SCHUMACHER et al., 1996; SCHUMACHER et al., 1999; DICKINSON et al., 2001; JACOBSON et al., 2003 - in press), hat sich eine Spülung der

---

Nasenhöhle mit SP4-Nährbouillon als äußerst effektives Prozedere beim Nachweis von Mykoplasmen erwiesen (BROWN et al., 1994; SCHUMACHER et al., 1996; MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1999c; MCLAUGHLIN et al., 2000; BROWN et al., 2001c; JACOBSON et al., 2003 - in press). Die Vermehrung der bei Schildkröten vorkommenden Mykoplasmen erfolgt in vitro sehr langsam. Mindestens drei Wochen in SP4-Nährbouillon bzw. bis zu 6 Wochen auf SP4-Spezialagar müssen zur Anzüchtung von Mykoplasmen kalkuliert werden (BROWN et al., 1994; BROWN et al., 1995; SCHUMACHER et al., 1996; MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1999c; BROWN et al., 2001c; JACOBSON et al., 2003 - in press). Günstig wirkt sich bei diesen Mykoplasmen eine Bebrütungstemperatur von 30° C aus, SP4-Spezialagar sollte in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet werden (JACOBSON et al., 1991b; BROWN et al., 1994; SCHUMACHER et al., 1996; MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1999c; MCLAUGHLIN et al., 2000; BROWN et al., 2001c; JACOBSON et al., 2003 - in press). Die auf dem SP4-Spezialagar entstehenden Mykoplasmen weisen die Kolonieform eines Spiegeleies, einer Maulbeere oder eines Blumenkohls auf (SCHUMACHER et al., 1996; BROWN et al., 2001c; JACOBSON et al., 2003 - in press). Die Verwendung von Nasentupfern mit Calcium-Alginat (MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1999c; MCLAUGHLIN et al., 2000) hat sich häufig als nicht sehr effektiv bei der Isolation von Mykoplasmen aus lebenden Tieren erwiesen. Wie elektronenmikroskopische Studien belegen, siedeln sich die Mykoplasmen bevorzugt an Orten wie dem ventrolateralen Anteil der Nasenhöhle direkt kaudal des Vestibulum nasi an (JACOBSON et al., 2003 - in press). Diese Stelle entspricht auch der von



MCLAUGHLIN (1997) histopathologisch festgestellten Lokalisation der stärksten Läsionen. Ein Vordringen via Nasentupfer an den ventrolateralen Aspekt der Nasenhöhle ist beim lebenden Tier aufgrund der sehr engen Nasengänge vermutlich nur schwer möglich.

Seit 1995 ist die PCR zu einem wichtigen Bestandteil der Mykoplasmosediagnostik bei der Schildkröte geworden (BROWN et al., 1995; MCLAUGHLIN et al., 1996b,a; SCHUMACHER et al., 1996; MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1998; HOMER et al., 1998; BROWN et al., 1999c; MCLAUGHLIN et al., 2000; BROWN et al., 2001c; DICKINSON et al., 2001; JACOBSON et al., 2003 - in press). Mittels Mykoplasmen-PCR werden regelmäßig Nasenspülproben oder Nasentupfer untersucht, vereinzelt wurden bereits auch Kloakentupfer, Eidotter, Albumin, Eischalenmembranen und Chorioallantois-Amnion-Flüssigkeit (CAF) als Material für die Mykoplasmen-PCR verwendet (MCLAUGHLIN et al., 1996b; MCLAUGHLIN, 1997; SCHUMACHER et al., 1999). Das häufig in verwendeten Tupfern enthaltene Calcium-Alginat kann laut SCHUMACHER et al. (1996) und JACOBSON et al. (JACOBSON et al., 2003 - in press) zur Hemmung der Polymerasekettenreaktion (PCR) führen. Besonders gute Erfolge lassen sich in der Mykoplasmen-PCR der Nasenspülproben mit einer vorherigen 24-48ständigen Anzüchtung der Isolate in SP4-Nährbouillon erzielen (SCHUMACHER et al., 1996; MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1999c; JACOBSON et al., 2003 - in press).

Nach vorhergehender Mykoplasmen-PCR ermöglicht die Durchführung einer Restriktionsenzymanalyse (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism) mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen (Sau 96 I, Age I und Nci I) die Differenzierung der unterschiedlichen Mykoplasmenarten. BROWN et al. (1995) nutzen die RFLP zur Differenzierung von *Mycoplasma agassizii*, *Mycoplasma testudinis* und *Mycoplasma H3110*. Das Segment des Mykoplasmenchromosoms, welches zur Analyse gewählt wird, ist das 16S-rRNA-Gen, welches konservierte Genus-spezifische DNS-Sequenzen und variable Spezies-spezifische DNS-Sequenzen enthält (SCHUMACHER et al., 1996). Auch MCLAUGHLIN (1997) verwendet die Restriktionsenzymanalyse zur Untersuchung der Mykoplasmen-PCR-Produkte.

Segment-Sequenzen des 16S-rRNA-Gens werden bei BRAUN et al. (1995) analysiert und mit denen bereits bekannter Mykoplasmen verglichen. Aufgrund dieser Sequenzanalyse kann eine taxonomische Einteilung der drei gefundenen Mykoplasmenspezies vorgenommen werden (BROWN et al., 1995).

Neben dem Erregernachweis lassen sich serologische Methoden zum Nachweis von mykoplasmenspezifischen Antikörpern einsetzen. Das seit 1992 bei der Diagnose der URTD der Landschildkröte regelmäßig verwendete Verfahren ist der Mykoplasmen-ELISA, der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (siehe SCHUMACHER et al., 1992). In der Regel untersucht man mittels Mykoplasmen-ELISA Blutplasma, selten gelangt auch Eidotterüberstand zur Untersuchung (MCLAUGHLIN, 1997; SCHUMACHER et al., 1999). Bei dem von SCHUMACHER et al. (1993) beschriebenen ELISA zur Detektion von

*Mycoplasma agassizii*-spezifischen Antikörpern im Plasma von Wüstenschildkröten (*Gopherus agassizii*) gelangen unterschiedliche mono- und polyklonale Antikörper zum Einsatz. Bei der ELISA-Ratio handelt es sich um den Quotienten der Adsorption der Probe zur Adsorption einer Negativkontrolle, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm. Der Schwellenwert zwischen positiver und negativer Mykoplasmen-ELISA-Probe wird zunächst bei einer Ratio von größer als zwei (SCHUMACHER et al., 1993; BROWN et al., 1994; SCHUMACHER et al., 1997; BROWN et al., 1999c) festgelegt, dann auf drei korrigiert (SCHUMACHER et al., 1996; LEDERLE et al., 1997; MCLAUGHLIN, 1997; BROWN et al., 1999b; MCLAUGHLIN et al., 2000; JACOBSON et al., 2003 - in press). Mittlerweile ist eine weitere Heraufsetzung des Schwellenwertes in Diskussion (JACOBSON et al., 2003 - in press).

Frühestens 6-8 Wochen post infectionem ist die Untersuchung mittels Mykoplasmen-ELISA positiv, bei reinfizierten Tieren ist ein Titeranstieg bereits nach 4 Wochen zu verzeichnen (SCHUMACHER et al., 1996; MCLAUGHLIN, 1997; SCHUMACHER et al., 1997; BROWN et al., 1999b). Dies deckt sich mit den von OLLENSCHLÄGER (1977) und ROTHE und AMBROSIUS (1968) beschriebenen Untersuchungen, nach der bei Sekundärimmunisierung eine schnellere Antikörperbildung zu verzeichnen ist.

#### **2.1.2.2.5 Therapie**

Zur Therapie der URTD werden unterschiedliche Antibiotika wie Doxycyclin und Enrofloxacin eingesetzt (ROSSKOPF, 1990). Unterstützende Maßnahmen wie

parenterale Flüssigkeitsgabe, Zwangsfütterung und Temperaturerhöhung werden zusätzlich von ROSSKOPF (1990) empfohlen.

Zur Behandlung der URTD der Wüstenschildkröte gibt JACOBSON (1992) Enrofloxacin in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpermasse (KM) an. Zusätzlich empfiehlt er die intranasale Instillation von mit steriler Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 verdünntem injizierbarem Enrofloxacin in täglichen Intervallen für mindestens einen Monat bzw. bis zum vollständigen Abklingen der Rhinitis-Symptome. Da Enrofloxacin hochgradig reizend auf die Augenlider und Konjunktiven wirken kann, sollte bei der Nasenspülung der Kontakt mit diesem Gewebe unbedingt vermieden werden (JACOBSON, 1992). Häufig erweist sich schon die tägliche Spülung der Nasenlöcher mit steriler physiologischer Kochsalzlösung als äußerst vorteilhaft bei der klinischen Behandlung der URTD (persönliche Erfahrung der Autorin).

Tylosin, welches im allgemeinen eine gute Wirksamkeit bei Mykoplasmeninfektionen besitzt (LUTZ, 1997), hat laut ROSSKOPF (1990) seine ehemalige Effektivität weitgehend verloren. JENKINS (1997) gibt Tylosin in einer Dosierung von 5mg/kg KM intramuskulär, einmal täglich über 10-60 Tage, als mögliche Therapie respiratorischer Symptome bei der Wüstenschildkröte an. Diese Dosierung verwenden auch CARPENTER et al. (2001) zur Behandlung der URTD der Schildkröten.

FRYE (1995) verwendet eine Dosis von 7,5-10 mg/kg KM Enrofloxacin peroral oder intramuskulär verabreicht und gibt die Empfehlung, dieses Medikament mit steriler Kochsalzlösung zu verdünnen, um so die häufig auftretenden

Gewebeirritationen zu vermeiden. Eine Dosierung von 5mg/kg KM Enrofloxacin intramuskulär, in einem Dosierungsintervall von 24 - 48 Stunden wird auch von PREZANT et al. (1994) für die Gopherschildkröte angegeben.

Interessant sind im Zusammenhang auch die unterschiedlichen Eliminations-Halbwertzeiten des Medikamentes bei den verschiedenen Schildkrötenspezies. So wird für die Griechische Landschildkröte (*Testudo hermanni*) eine Eliminations-Halbwertzeit von 7,3 Stunden für Enrofloxacin angegeben (SPÖRLE et al., 1991), während sie bei *Gopherus agassizii* 23,1 Stunden beträgt (PREZANT et al., 1994). Bei der indischen Strahlenschildkröte (*Geochelone elegans*) ist die Eliminationshalbwertzeit von Enrofloxacin 5,1 Stunden (RAPHAEL et al., 1994). Daher unterstreichen PREZANT et al. (1994) die Tatsache, daß pharmakokinetische Studien für jede einzelne Schildkrötenart notwendig sind, anstatt die Dosierungen für andere Spezies einfach zu übernehmen. Diese Untersuchungen erklären auch die Angabe unterschiedlicher Dosierungen von Enrofloxacin (zwischen 5-10 mg/kg KM) in differierenden Behandlungsintervallen der verschiedenen Spezies, wie sie MADER (1998), JACOBSON (1999) und CARPENTER et al. (2001) in ihren Empfehlungen zur antimikrobiellen Therapie angeben. Da die meisten durchgeführten Untersuchungen an klinisch gesunden Tieren erfolgen und neben vielen anderen Faktoren auch die Umgebungstemperatur eine entscheidende Rolle spielt, weist JACOBSON darauf hin, daß die metabolische Skalierung von Antibiotika zwar ein sinnvolles Werkzeug zur Dosierung dieser Substanzen darstellt, bei kranken Reptilien aber durchaus an ihre Grenzen stößt (JACOBSON, 1996).

Neben der gewebereizenden Wirkung sollte man sich bei der Verabreichung von Enrofloxacin der Tatsache bewußt sein, daß Fluorochinolone im allgemeinen überwiegend renal ausgeschieden werden, während nur ein kleiner Teil biliär sezerniert wird (KROKER et al., 2002). Während laut KLINGENBERG (1996) eine geringgradige Beeinträchtigung der Nieren noch keine Anpassung der Dosis erfordert, ist dies bei stärkerer Schädigung der Nieren durchaus notwendig. So wird beim Menschen eine Dosisreduktion von bis zu 50 % bei Nierenleiden vorgenommen (KLINGENBERG, 1996). Da an URTD erkrankte Schildkröten häufig auch Nierenschädigungen aufzeigen, sollte während einer Behandlung mit Enrofloxacin auf jeden Fall eine regelmäßige Kontrolle der Nierenwerte stattfinden und gegebenenfalls Flüssigkeit verabreicht werden.

Die bisherige Therapie der URTD der Landschildkröte führt noch zu keinem vollkommen befriedigenden Ergebnis. Immer wieder treten laut ROSSKOPF (1990) auch bei lange behandelten und zwischenzeitlich asymptomatischen Tieren Rezidive nach Monaten oder sogar Jahren auf. SCHUMACHER et al. (1996) erklärt sich das unbefriedigende Ergebnis der meisten URTD-Behandlungsversuche unter anderem dadurch, daß es äußerst schwierig ist, eine bakterizide Konzentration der Therapeutika an den Aufenthaltsorten der Mykoplasmen aufrecht zu erhalten. Das größte Problem bei der Bekämpfung der URTD der Landschildkröten stellen jedoch die klinisch inapparenten Träger und das intermittierende Auftreten klinischer Symptome innerhalb eines Bestandes dar. Bisher liegen keine Berichte über Entwicklung oder Erprobung von attenuierten Lebend- oder inaktivierten Vakzinen vor.

## 2.2 Herpesviren

### 2.2.1 *Herpesviridae*

#### 2.2.1.1 Morphologie und Klassifikation

Die große Familie der *Herpesviridae* hat durch die Vielzahl ihrer Mitglieder ein weites Feld an empfänglichen Wirten im Bereich der Säugetiere, der Fische, der Vögel, Amphibien und Reptilien. Laut KAADEN (2002) besitzen die einzelnen Herpesviren an sich aber meist ein sehr enges, auf bestimmte Spezies fixiertes Wirtsspektrum. MINSON et al. (2000) schreiben den Mitgliedern der Unterfamilie *Alphaherpesvirinae* im Allgemeinen ein größeres Wirtsspektrum als denen der *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae* zu.

Herpesvirionen sind zwischen 102-200 nm große, behüllte Partikel mit ikosaedrischem Kapsid. Morphologisch kann man vier Einheiten des Herpesvirus unterscheiden. Die doppelsträngige, unsegmentierte lineare DNS in Form eines Torus ist im Zentrum des Innenkörpers (Core) neben mehreren Proteinen angesiedelt. MINSON et al. (2000) schreiben den meisten Vertretern dieser Familie eine Genomgröße zwischen 125-240 kbp zu. Das Molekulargewicht der DNS beträgt zwischen 80-150 Millionen Dalton (ROIZMAN, 1996). DNS und Kernproteine werden von dem Kapsid umgeben, welches aus sechs verschiedenen Proteinkomponenten besteht und dreidimensional um die virale DNS und die Kernproteine arrangiert ist (WAGNER, 1974). Laut MURPHY (1996) und ROIZMAN (1996) besteht das Kapsid aus 162 (150 hexagonalen und 12 pentagonalen) prismatischen Kapsomeren, und besitzt eine Größe zwischen 100 und 120 nm. Zwischen

Nukleokapsid und Hülle ist das virale Tegument eingelagert. Dieses besteht aus mehreren Proteinen, die in einer amorphen, teilweise asymmetrischen Schicht angeordnet sind (KAADEN, 2002). Die Dicke des Teguments kann laut ROIZMAN (1996) je nach Lokalisation des Virions in der infizierten Zelle variieren, die Menge des Teguments ist eher durch das Virus als den Wirt bestimmt. Die umhüllende, doppelschichtige lipidhaltige Membran, der sogenannte Envelope, ist mit Oberflächenprojektionen versehen (KAADEN, 2002). Der Envelope besitzt nach MINSON et al. (2000) in etwa eine Größe von 200 nm. Die sogenannten Spikes sind laut ROIZMAN (1996) durchschnittlich 8 nm lang und bestehen aus Glykoproteinen, die in Anzahl und Menge variieren können. Laut KAADEN (2002) tragen Herpesviren in ihrer Hüllmembran einen Fc-Rezeptor, der unterschiedlich für die einzelnen Spezies ist und der die Adsorption an die jeweiligen Zielzellen vermittelt. Aufgrund ihrer Virushüllmembran sind Herpesviren sehr labil gegenüber Umwelteinflüssen, Detergenzien und Desinfektionsmitteln (KAADEN, 2002).

Herpesviren weisen einige eindeutige Charakteristika auf, die mit ihrer Pathogenese zusammenhängen (CHEVILLE, 1994). Sie haben häufig die Fähigkeit zu einer inapparenten rekurrierenden Infektion; d.h. sie infizieren den Wirt und bleiben klinisch unauffällig. Diese Viren können in ihren Primärwirten verbleiben, ohne dort jemals eine Erkrankung auszulösen. Bei Schwächung des Immunsystemes oder bei Infektion eines Sekundärwirtes allerdings können sie Auslöser schwerer Allgemeinerkrankungen sein. Auch können Herpesviren zu inapparenten Infektionen bei adulten Tieren und zu letal verlaufenden Erkrankungen bei Neugeborenen führen.



CHEVILLE (1994) erklärt die unterschiedliche altersabhängige Empfänglichkeit durch die Unreife des Immunsystems und durch die Fähigkeit der Makrophagen aktiviert zu werden. Nach KAADEN (2002) kann die Vielzahl an betroffenen Organsystemen zu unterschiedlichsten Krankheitserscheinungen führen. Neben der Haut und den Schleimhäuten des Respirations- und Genitaltraktes können Nieren und Zentralnervensystem, lymphatische Organe und Immunzellen betroffen sein.

Die Infektion erfolgt aerogen, oral, durch Kontakt über die Schleimhäute oder venerisch (KAADEN, 2002). Laut MINSON et al. (2000) wurde von einer Übertragung durch Vektoren bisher nicht berichtet. Die Replikation erfolgt im Zellkern und nach Überstehen einer Erkrankung induzieren Herpesviren eine lebenslange latente persistierende Infektion. Laut CHEVILLE (1994) sind die nukleären Veränderungen schnell und hochgradig. Der initialen Schwellung des Nukleus folgen nukleäre Kontraktion und Auflösung sowie periphere Verdrängung des Chromatins. Durch das Fehlen des Chromatins erhält das Karyoplasma schließlich ein homogenes, granuläres Erscheinungsbild.

Eine Einteilung der Herpesviren erfolgt aufgrund verschiedener Kriterien. So kann man aufgrund ihres Zelltropismus und ihrer Genomorganisation laut KAADEN (2002) eine Einteilung in Subfamilien vornehmen. Das internationale Komitee der Virustaxonomie (ICTV) hat eine Unterteilung der *Herpesviridae* in drei Subfamilien (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae*) auf der Basis ihrer biologischen Eigenschaften vorgenommen (MINSON et al., 2000).

*Alphaherpesvirinae* haben ein variables Wirtsspektrum, einen recht kurzen Reproduktionszyklus und vermehren sich schnell in Zellkulturen mit einer nachfolgenden effizienten Zerstörung der infizierten Zellen. Sie besitzen die Fähigkeit, latente Infektionen vornehmlich, aber nicht ausschließlich, in sensorischen Ganglien zu etablieren. Laut KAADEN (2002) können Organmanifestationen variieren; Affinitäten bestehen aber v.a. neben dem zentralen Nervensystem auch zum Respirations- bzw. Genitaltrakt und zur Haut; neben den Ganglienzellen persistieren diese Herpesviren auch in den Lymphozyten.

Nach ROIZMAN (1996) definieren sich die Mitglieder der Subfamilie der *Betaherpesvirinae* durch folgenden Eigenschaften: Sie besitzen ein enges Wirtsspektrum und einen langen Reproduktionszyklus, vermehren sich nur langsam in Zellkulturen und führen zu einer Vergrößerung der infizierten Zellen (Zytomegalie). In latenter Form kann das Virus in Sekretionsdrüsen, lymphoretikulärem Gewebe, Nieren und anderen Geweben vorliegen. KAADEN (2002) beschreibt zusätzlich das Vorkommen latenter Infektionen im zentralen Nervensystem. Auch beschreibt er die Häufigkeit bestehender Allgemeinerkrankungen mit Affinität der Viren zu Nieren und Leber.

*Gammaherpesvirinae* besitzen ein meist auf eine Familie oder Ordnung begrenztes Wirtsspektrum (ROIZMAN, 1996). In vitro findet eine Replikation in lymphoblastoiden Zellen statt, wobei es in einigen epitheloiden und fibroblastischen Zellen zu einer lytischen Infektion kommt. Viren dieser Gruppe besitzen laut ROIZMAN (1996) eine spezifische Affinität zu T- oder B-

Lymphozyten. Hierbei liegt die Infektion häufig in einem latenten Stadium vor, ohne infektiöse Nachkommenschaft zu produzieren. Latente Formen dieser Subfamilie findet man vor allem in lymphoidem Gewebe. Auch KAADEN (2002) beschreibt bei den *Gammaherpesvirinae* eine häufige Persistenz des Virus ohne oder zumindest nur mit einer minimalen Genexpression.

#### **2.2.1.2 Unterschiedliche Einteilungsmethoden der Herpesviren bei Reptilien**

In den achtziger Jahren teilen die Autoren HOFF und HOFF (1984) die ihrer Meinung nach mit am besten erforschten Viren der Amphibien und Reptilien, die Herpesviren, nach einem Schema in Anlehnung an CLARK und LUNGER (1981) ein. So werden hier vier Kategorien unterschieden: Viren, die unter bestimmten Umständen Erkrankungen bei Reptilien auslösen; Viren, die mit Tumoren der Reptilien in Verbindung stehen; Viren, die nicht pathogen für Reptilien sind und diese nur als Virusreservoir nutzen und solche Viren, welche auf Reptilien begrenzt sind und deren krankheitsauslösende Wirkung noch nicht bekannt ist. Genau wie die Viren der Schlangen werden jene der Schildkröten dabei der ersten Kategorie zugeordnet. Die Viren der Echsen werden der vierten Kategorie zugeordnet (HOFF und HOFF, 1984). Mittlerweile wurden diese Einteilungskriterien allerdings aufgrund neuerer Erkenntnisse von anderen ersetzt.

So stellt eine weitere Differenzierungsmöglichkeit der Herpesviren ihre unterschiedliche Genomorganisation dar. Laut ROIZMAN (1996) können sechs Gruppen (A, B, C, D, E und F) je nach der Arrangement der Genomsequenzen

unterschieden werden. Die Nomenklatur der Herpesviren beschreibt ROIZMAN (1996) allerdings als äußerst problematisch aufgrund der Definition der Spezies und der Klassifikation der Herpesviren und verweist hierbei auf die fortschreitende Komplettierung der Nukleotidsequenzen verschiedener Herpesviren und den somit entstandenen Anreiz, diese Klassifizierung neu zu überdenken.

### 2.2.2 Herpesviren der Schildkröten

Keines der bei Reptilien und Amphibien beschriebenen Herpesviren konnte u.a. laut HOFF und HOFF (1984), MURPHY (1996) und TEIFKE (2000) bisher einer bestimmten Subfamilie zugeordnet werden. Dies gilt sowohl für die Herpesviren der Land- und Wasserschildkröten, als auch für jene der Echsen, Schlangen und Amphibien. MINSON et al. (2000) bezeichnen die bisher beschriebenen Herpesviren der Schildkröten (Chelonidae) mit den Abkürzungen ChHV1 bis ChHV 4 (Chelonian Herpesvirus 1- 4). Dabei erfolgt eine Klassifikation der Schildkrötenherpesviren hauptsächlich aufgrund von gemutmaßten Differenzierungen ihrer Wirtsspektren. ChHV 1 wurde zuerst in Verbindung mit der sogenannten Gray Patch Disease von *Chelonia mydas* in Verbindung gebracht; ChHV 2 mit der durch eine Herpesvirusinfektion ausgelöste letale Lebernekrose bei *Clemmys marmorata*. ChHV 3 wurde im Zusammenhang eines ähnlichen Krankheitsbildes bei *Chrysemys picta* und *Graptemys pseudogeographica* beschrieben. ChHV 4 wurde aus einer *Geochelone chilensis* mit nekrotisierender Stomatitis isoliert (TEIFKE et al., 2000). Zu dieser

Einteilung sollte allerdings angemerkt werden, daß dies bei weitem nicht alle bis heute bei Schildkröten beschriebenen Herpesviren beinhaltet.

TEIFKE et al. (2000) führen eine Sequenzierung eines Teilabschnittes des UL5 Gens (Protein des Helikase/Primase - Komplexes) eines Chelonid-Herpesvirus durch. Das hierbei untersuchte Herpesvirus wurde zuvor aus dem Maultupfer einer in Deutschland gehaltenen *Testudo hermanni* im Zuge eines Stomatitis-Rhinitis-Komplexes isoliert. Die Aminosäuresequenz des ChHV UL5 Homologes zeigt dabei eine 50 %ige Übereinstimmung mit dem UL5 Protein von Alphaherpesviren. Somit ordnen TEIFKE et al. (2000) erstmals ein Herpesvirus der Schildkröten einer bestimmten Subfamilie zu. Auch ein weiteres neues Herpesvirus, welches im Gewebe von *Chelonia mydas* mit Fibropapillomen gefunden wurde, wird von UNE et al. (2000) und YU et al. (2000; 2001) mittels PCR und partieller Sequenzierung untersucht und aufgrund phylogenetischer Analysen der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* zugeordnet.

MARSCHANG et al. (2001a) vergleichen in einer Studie 6, bzw. 16 verschiedene Chelonid-Herpesviren mit Hilfe von Neutralisationstest und Restriktionsenzymanalyse der viralen DNS miteinander und kommen zu dem Schluß, daß sich ein Großteil der Isolate sehr ähnlich ist. Das Isolat einer *Testudo (Agrionemys) horsfieldii* allerdings differiert in beiden Studien stark von den restlichen Isolaten in allen vorgenommenen Untersuchungen. Daher wird von MARSCHANG et al. von mindestens zwei verschiedenen Sero- und Genotypen bei infizierten Schildkröten ausgegangen.

### 2.2.2.1 Herpesviren bei Wasserschildkröten und Meeresschildkröten

Unterschiedliche Erkrankungen der Wasserschildkröten werden mit einer Herpesvirusinfektion in Zusammenhang gebracht. Der Nachweis einer Herpesvirose gelang bisher bei folgenden Spezies: bei *Chelonia mydas*, der Suppenschildkröte (unter anderem von REBELL et al., 1975; JACOBSON et al., 1986); bei *Clemmys marmorata*, der Pazifik-Wasserschildkröte (FRYE et al., 1977); bei *Chrysemys picta*, der Zierschildkröte (COX et al., 1980), bei *Graptemys pseudogeographica*, der falschen Landkartenschildkröte und *Graptemys barbouri*, der Barbour-Höckerschildkröte (JACOBSON et al., 1982), sowie bei *Caretta Caretta*, der unechten Karettschildkröte (LACKOVICH et al., 1999). Antikörper gegen Herpesviren werden im Serum von *Trionyx sinensis*, chinesischen Weichschildkröten, nachgewiesen (NIE und LU, 1999).

Im Vordergrund der Symptomkomplexe stehen hierbei die Gray Patch Disease der Meeresschildkröte, die Lung Eye and Trachea Disease, degenerative Hepatitiden bei Meeres- und Weichschildkröten mit akuten Todesfällen und die Fibropapillomatose der Meeresschildkröten.

Bei der Gray Patch Disease (GPD) oder Graufleckenerkrankung der großen Suppenschildkröte (*Chelonia mydas*) auf der Insel Cayman wird erstmals Herpesvirus mit einer Erkrankung der Schildkröten in Verbindung gebracht (REBELL et al., 1975). Hierbei kann eine Transmission der Erkrankung durch Kratzwunden mittels bakterienfreiem Material aus Läsionen bei permissiven Tieren im Alter von 6-8 Wochen ausgelöst werden. Aufgrund intranukleärer Einschlusskörperchen und der Morphologie der Viruspartikel in der

elektronenmikroskopischen Untersuchung wird eine Zuordnung des beteiligten Virus zu den *Herpesviridae* vorgenommen (REBELL et al., 1975). Isolationsversuche des Virus führen auf Hautzellen von *Chelonia mydas* bei 25°C innerhalb von 72 Stunden zum Erfolg und zur Benennung eines neuen Virus, des Gray Patch Herpesvirus (GPV) (KOMENT und HAINES, 1977). HAINES und KLEESE (1977) untersuchen den Effekt unterschiedlicher Wassertemperaturen auf die klinischen Erscheinungen der Gray Patch Disease. Neben der Wassertemperatur machen die Autoren auch organische Verschmutzung und Überbesetzung (Streß) als auslösende Faktoren für den Ausbruch der Erkrankung mit verantwortlich. Diese These wird ebenso durch die Publikation von REME (1980) unterstützt, welcher Erkrankungen von *Chelonia mydas* auf der Insel Réunion untersucht. Bei diesen Tieren sind erste Hautläsionen ab Ende der dritten Lebenswoche ersichtlich. REME kann das Virus nicht direkt nachweisen, vermutet aber in diesem Fall eine Herpesvirusinfektion aufgrund der auftretenden klinischen Veränderungen und deren Weiterentwicklung. Neben Behältergröße, Besatzdichte, Temperatur und Salzgehalt des Wassers beschreibt er auch den Sozialstreß innerhalb der Gruppe als entscheidende Faktoren für Ausbruch, Verbreitung und Heilung der Erkrankung.

Die Lung Eye Trachea Disease (LETD) oder Konjunktivitis-Tracheitis-Pneumonie-Komplex wird von JACOBSON et al. (1986) bei 15-20 Monate alten *Chelonia mydas* auf der Insel Cayman beschrieben. Histologische und elektronenmikroskopische Befunde der betroffenen Organe erkrankter Tiere und infizierter Zellkulturen (Embryofibroblasten und Nierenzellen von

Meeresschildkröten) erlauben laut JACOBSON et al. (1986) den Rückschluß auf eine neue durch Herpesviren induzierte Erkrankung der Suppenschildkröte. GLAZEBROOK et al. (1993) berichten von einer ähnlich verlaufenden Erkrankung bei *Chelonia mydas* und *Caretta caretta*. Allerdings gelingt ihnen keine Isolation des Virus aus dem Lungengewebe erkrankter Tiere auf Nierenzellen von Meeresschildkröten. CURRY et al. (2000) untersuchen unter anderem die Infektiosität des Virus der Lungen-Augen-Trachea-Erkrankung (LETV) bei unterschiedlichen Salzgehalten als Model der Herpesvirusinfektionen bei Wasserschildkröten. COBERLEY et al. (2001a; 2001b) führen mittels ELISA den Nachweis von Antikörpern gegen LETD-Herpesvirus bei freilebenden *Chelonia mydas* in Florida.

FRYE et al. (1977) beschreiben eine akute hepatische Nekrose aufgrund einer Herpesvirusinfektion bei zwei *Clemmys marmorata*, wobei eines der beiden Tiere erst drei Wochen zuvor in einer Bucht gefangen worden war. Lichtmikroskopisch werden intranukleäre Einschußkörperchen in den Hepatozyten, in den Nieren und in der Milz nachgewiesen. Zusätzlich finden sie mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung sowohl intranukleäre als auch intrazytoplasmatische Einschußkörperchen in Leber und Milz.

Von einer weiteren Herpesvirusinfektion berichten COX et al. (1980) bei *Chrysemys picta*. Dieses Tier stirbt sechs Tage nach der chirurgischen Entfernung eines Abszesses am Kopf. Auffällig während der Sektion sind neben einem pulmonären Ödem eine gestaute Milz und eine geschwollene, brüchige Leber mit hochgradig gefüllter Gallenblase. Histologisch finden sich eine



Lebernekrose und Pneumonie begleitet von intranukleären eosinophilen Einschußkörperchen in Hepatozyten und Lunge. Elektronenmikroskopisch lassen sich sowohl in den Hepatozyten als auch in den Epithelzellen der Bronchien Viruspartikel nachweisen.

JACOBSON et al. (1982) diagnostizieren bei *Graptemys pseudogeographica* und bei *Graptemys barbouri* eine Infektion mit Herpesviren. Vorberichtlich zeigen die zwei Tiere neben einem subkutanen Ödem Lethargie und Anorexie, in der histologischen Untersuchung fällt eine sehr blasse Leber mit multifokalen Nekrosen auf. Auch hier können intranukleäre eosinophile Einschußkörperchen in den Hepatozyten nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung finden sich intranukleäre und intrazytoplasmatische Viruspartikel in degenerierten Leberzellen. Überstände von Vipernherz-Zellkulturen, die mit Organproben der Leber inokuliert wurden, werden intraperitoneal auf gesunde *Platemys platycephala*, Rotkopf-Plattschildkröten, übertragen, ohne daß diese daraufhin Krankheitserscheinungen zeigen (JACOBSON et al., 1982).

Der Nachweis von Antikörpern gegen Herpesviren im Serum chinesischer Weichschildkröten, *Trionyx sinensis*, gelingt NIE und LU (1999). Ein Zusammenhang zwischen klinischen Anzeichen einer Erkrankung in Form von Haut- und Panzerläsionen und serologisch positiven Tieren konnte dabei nicht festgestellt werden. Nur 6,6 % der Schildkröten erweisen sich als positiv im Neutralisationstest, bei welchem ein nicht näher definiertes Virusisolat einer *Testudo hermanni* als Antigen verwendet wurde. 11 % der Tiere zeigten ein positives Ergebnis im Dot-ELISA. Die Autoren konstatieren aufgrund ihrer

Untersuchungen, daß die Herpesvirusinfektion bei *Trionyx sinensis* kein ernsthaftes Problem darzustellen scheint.

Aus dem Jahr 1938 existieren erste Berichte aus New York über fibropapillomähnliche Zubildungen der Haut bei *Chelonia mydas*, welche zwei Jahre zuvor in der Region von Key West gefangen worden war (SMITH und COATES, 1938). 1939 wird in einer weiteren Veröffentlichung ein Zusammenhang dieser Veränderungen mit Trematoden beschrieben (SMITH und COATES, 1939). JACOBSON et al. (1989) berichten 1989 über kutane Fibropapillome (FP) bei sechs juvenilen Suppenschildkröten, *Chelonia mydas*, in Florida. Diese Tiere werden einzeln gehalten und über einen Zeitraum von 6 Monaten untersucht. In der histologischen Untersuchung zeigen die Fibropapillome eine hyperplastische Epidermis und verdickte hyperzelluläre Dermis. In keiner der Proben können Trematodeneier entdeckt werden, auch der versuchte Nachweis von Papillomavirus-DNS mißgelingt. In der feinstrukturellen Untersuchung gelingt die Darstellung intrazytoplasmatischer Vakuolen, in denen sich in einigen Fällen 155 bis 190 nm große Partikel mit elektronendichten Zentren befinden. Im selben Jahr beschreiben MANSELL et al. (1989) die Isolation und Ultrastruktur einer aus Fibropapillomen der Suppenschildkröte angezüchteten Fibroblastenlinie. Diese Zelllinie soll zur weiteren Aufklärung der Ätiologie der immer häufiger auftretenden Fibropapillome bei *Chelonia mydas* (GTFP = Green Turtle Fibropapilloma) beitragen, wobei die Autoren zwar ein virales Agens vermuten, dieses aber noch nicht nachweisen können (MANSELL et al., 1989). Bei der histopathologischen Untersuchung an Fibropapillomatose erkrankter

Schildkröten können JACOBSON et al. (1991a) eosinophile intranukleäre Einschlusskörperchen darstellen. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigt sich, daß die Einschlüsse aus 77-90 nm großen, virus-ähnlichen Partikeln bestehen, deren Umhüllung an der Kernmembran stattfindet. Die reifen umhüllten Partikel kommen im Zytoplasma vor und sind 110-120 nm groß. Aufgrund der Morphologie, Größe und Lokalisation der Partikel werden diese Viren der Familie den *Herpesviridae* zugeordnet (JACOBSON et al., 1991a). HERBST (1994) berichtet vom Vorkommen kutaner Fibropapillome bei weiteren Schildkrötenspezies: bei *Caretta caretta*, der unechten Karettschildkröte in Florida; bei *Lepidochelys olivacea*, der Bastardschildkröte aus Costa Rica und bei *Natator depressus*, einer australischen Meeresschildkröte. ADNYANA et al. (1997) berichten von Fibropapillomen bei *Chelonia mydas* in Indonesien. MATUSHIMA et al. (1999) schildern das Vorkommen kutaner Fibropapillome bei *Chelonia mydas* auch in Brasilien.

Als besonders ungünstige Lokalisation beschreiben BROOKS et al. (1994) okuläre Fibropapillome bei gestrandeten *Chelonia mydas*, welche zu Blindheit und Entkräftung der betroffenen Tiere führen. HERBST und KLEIN (1995) diskutieren die Rolle von Kofaktoren der Erkrankung in einer weiteren Veröffentlichung und verweisen hierbei auf die je nach geographischer Region stark variable Prävalenz der Fibropapillomatose bei *Chelonia mydas* von 0 bis 92 %. MIAO et al. (2001) untersuchen die Rolle der Verschmutzung durch chemische Substanzen als Kofaktor der FP bei *Chelonia mydas* in Hawaii. AGUIRRE et al. (1995) untersuchen adrenokortikale, hämatologische und

biochemische Werte gesunder und an Fibropapillomatose erkrankter Suppenschildkröten. Aufgrund der unterschiedlichen erhaltenen Werte machen die Autoren chronischen Streß und Immunsuppression für die Erkrankung mit verantwortlich. Auch WORK et al. (2001) vermuten aufgrund der von ihnen durchgeführten Untersuchungen über das Verhältnis der Heterophilen zu den Lymphozyten und der Eosinophilen zu den Monozyten bei erkrankten und gesunden Tieren, daß Schildkröten mit Fibropapillomen stark immunsupprimiert sind. Um die biologischen Eigenschaften der Fibropapillomatose von *Chelonia mydas* besser zu charakterisieren, führen PAPADI et al. (1995) eine Durchflußzytometrie von Blutzellen, von Dermis normaler Haut, von Dermis kutaner Fibropapillome und von viszeralen fibropapillärer Zubildungen durch. Hierbei zeigt die DNS aller Proben ähnliche Histogramme, was auf einen normalen Zellzyklus hinweist. HERBST et al. (1995a; 1995b) unternehmen eine Übertragungsstudie mit filtrierten, zellfreien Fibropapillomaextrakten von freilebenden Suppenschildkröten. Hierbei werden Filter mit 0,45 µm Porengröße verwendet, um Bakterien und intakte Zellen zu entfernen. Sowohl filtrierte, als auch unfiltrierte Tumorphomogenate führen zur Ausprägung von Fibropapillomen, welche sich histologisch bis auf das Fehlen von Endoparasiten nicht von spontanen Tumoren unterscheiden lassen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen erlauben die Zuordnung des ätiologischen Agens zu den *Herpesviridae* (HERBST et al., 1995a). Einen Hinweis auf weitere Viren finden HERBST et al. (1995a) nicht. Eine gleichzeitig durchgeführte serologische Untersuchung unterstützt die These des Herpesvirus als auslösendes Agens (HERBST et al., 1998). HERBST et al. belegen hierbei, daß ein mittels ELISA

durchgeführter serodiagnostischer Test eine starke Antikörperantwort gegen LETV zeigt. Bei der Verwendung von Antigen gegen spirorchide Trematoden können in dieser Studie keine Antikörper im ELISA nachgewiesen werden. In einer weiteren Publikation beschreiben HERBST et al. (1996) die Charakterisierung der Tumorphomogenate mittels Chloroformbehandlung und Ultrazentrifugation. Chloroformbehandlung zerstört die tumorauslösende Aktivität des Homogenats vollkommen, während die Ultrazentrifugation zu einem völligen Verlust im Überstand und zu einer Reduzierung der tumorauslösenden Wirkung im Pellet führt. Von CASEY et al. (1997) veröffentlichte Studien weisen auf die mögliche Beteiligung von Retroviren bei der Fibropapillomatose von *Chelonia mydas* aus Hawaii hin. LACKOVICH et al. (1999) gelingt mittels Consensus Primer PCR der Nachweis, daß Fibropapillome regelmäßig mit dem Auftreten von Herpesviren verknüpft sind. So finden sie diese Viren immer regulär in FP-Tumorgewebe oder in einem Umkreis von 2 cm, im gesunden Gewebe jedoch können Herpesviren nicht nachgewiesen werden. Die partielle Sequenzierung des Herpesvirus-DNS-Polymerase-Genes bei 6 *Caretta caretta* und 2 *Chelonia mydas* im Vergleich ergibt, daß sich die Viren nur in einer Aminosäure des sequenzierten Abschnittes unterscheiden. Der Versuch, Papilloma- oder Herpesviren mittels Immunhistologie mit Peroxidase nachzuweisen, mißlingt (MATUSHIMA et al., 1999). Auch BROWN et al. (1999a) können in keiner der von ihnen mittels PCR untersuchten FP-Gewebeproben Papillomaviren nachweisen. YU et al. (2000; 2001) untersuchen ein neu gefundenes Herpesvirus in Verbindung mit Fibropapillomen bei *Chelonia mydas* in Hawaii mittels PCR und

Restriktionsenzymanalyse. LU et al. (2000) untersuchen Gewebeproben von *Chelonia mydas* mit und ohne Anzeichen einer Fibropillomatose. Im Tumorgewebe und in den meisten Organen erkrankter Schildkröten weisen die Autoren mittels PCR Herpesvirussequenzen nach und liefern somit ein weiteres Argument für die ätiologische Rolle des Herpesvirus bei der FP der Meeresschildkröten. QUACKENBUSH et al. (2001) unterstützen durch ihre Untersuchungen mittels PCR in Fibropapillomen erkrankter Meeresschildkröten die Annahme, daß Herpesviren bei der Fibropapillomatose eine entscheidende Rolle spielen.

### 2.2.2.2 Herpesviren bei Landschildkröten

#### 2.2.2.2.1 Klinik

Die Herpesvirusinfektion der Landschildkröten wird mit den verschiedensten Symptomkomplexen bei vielen unterschiedlichen Spezies in Zusammenhang gebracht. HARPER et al. (1982) beschreiben als Erste im Zusammenhang mit einer Herpesvirusinfektion einen pharyngealen Abszeß bei einer *Gopherus agassizii* mit gelben, käsigen Belägen in Maulhöhle und Pharynx, welche zum Verschuß der Glottis führten. Stomatitis und Pharyngitis wird seitdem von etlichen Autoren häufig im Zusammenhang mit Rhinitis und Dyspnoe in USA und Europa beschrieben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mit Herpesviren assoziierte Erkrankungen der Landschildkröten

Autoren/Jahr	Spezies	Symptome	Land
HOLT und COOPER, 1976	TG	Ulzera Zunge, Hämorrhagie	GB

Autoren/Jahr	Spezies	Symptome	Land
HARPER et al., 1982	GoAg	Pharyngealer Abszeß	USA
JACOBSON et al., 1985	GeChi	Stomatitis, Nasen- und Augenausfluß	USA
COOPER et al., 1988	TG	Stomatitis	GB
HELDSTAB und BESTETTI, 1989	TH	Stomatitis Dyspnoe Kreisbewegungen	CH
LANGE et al., 1989	TH, AH	Stomatitis, Enteritis	D
BRAUNE et al., 1989	TH, TM, AH, GeChi, GePard, MalTon	Stomatitis, Enteritis	D
MÜLLER et al., 1990	TH, TG	Stomatitis, Dyspnoe	CH
OETTLE et al., 1990	HomAreo, ChersAng, GePard	Stomatitis, Enteritis, Pneumonie, Parese Hintergliedmaßen	SüdAfr
PETTAN et al., 1991	GoAg	Obstipation Colon, Stomatitis, URTD	USA
BIERMANN und BLAHAK, 1993	TH	Stomatitis, Rhinitis	D
KABISCH und FROST, 1994	TH, TG, TM, AH	Gewichtsreduktion, Emphysem, Stomatitis, Rhinitis, Enteritis	D
BIERMANN, 1995	TH, AH	Stomatitis, Pharyngitis, Salivation	D
PETTAN-BREWER et al., 1996	GoAg	Obstipation Colon, Bronchopneumonie, Stomatitis, URTD	USA
MARSCHANG et al., 1997a	TH, TG	Konjunktivitis, Stomatitis, Rhinitis	D
MARSCHANG et al., 1997b	TH, TG	zum Teil Stomatitis, Rhinitis	D
POSTHAUS et al., 1997	TH, TG, TM, AH, GePard	zum Teil Stomatitis, Glossitis	CH
WENKER et al., 1997	THB	Rhinitis, Parese Hintergliedmaßen	CH
FROST und SCHMIDT, 1997	TH, TG, TM, AH, GeCarb	k. A.	D, Ch
DRURY et al., 1998	TH, GePard, AH	Nasen- und Augenausfluß, Paralyse	GB
MURO et al., 1998	TG (TH, AH obB)	Chronische Rhinitis, Sialorrhoe, Stomatitis, Konjunktivitis, Ulzera	E
MARSCHANG et al., 1999	AH	Stomatitis	D
MARSCHANG, 1999	TG, TH, AH, GeDent	Stomatitis, Pharyngitis, Schwellung Hals	D, CH, I
KÜBBER-HEISS et al., 1999	TH, AH, TG	Stomatitis, Rhinitis	A
UNE et al., 1999	MalTorn, AH	Stomatitis, Rhinitis, Pharyngitis	Japan
DRURY et al., 1999a	TG	Stomatitis, Ödeme, Nasenausfluß	GB
DRURY et al., 1999b	TH, TG, GePard	Nasen/Augenausfluß, Paralyse	GB
ORIGGI und JACOBSON 1999	TH (k.w.A.)	k.A.	USA Europa

Autoren/Jahr	Spezies	Symptome	Land
SCHMIDT, 2000	TH, TG, AH, TM (AR, TK, TC im NT)	akute Todesfälle, Stomatitis	D
TEIFKE et al., 2000	TH, AH	Stomatitis, Rhinitis, subkutane Ödeme	USA D, Ch
BLAHAK, 2000	TG, GePard, TK, ManEm, MalTorn	Stomatitis, Rhinitis, ZNS Störungen	D
MARTINEZ-SILVESTRE, 2001	TGG	Stomatitis, chronische Rhinitis	E
McARTHUR, 2001	TH, GePard	Lymphoproliferative KH, URTD, Parese	GB
MARSCHANG, 2001a	TH, TG, AH	Stomatitis	D, Ch, E, USA
MARSCHANG, 2001b	TG, TH, TM	Stomatitis und URTD	I
ORIGGI et al., 2001a	TH, TG	URT, Stomatitis	D, F, USA
ORIGGI et al., 2001b	TG	Stomatitis, keine Rhinitis	USA, D
HERVAS, 2002	AH	klinisch inapparent, Gewichtsreduktion	E

Spezies: AH = *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*; ChersAng = *Chersinia angulata*; GeCarb = *Geochelone carbonaria*; GeChi = *Geochelone chilensis*; GePard = *Geochelone pardalis*; GeDent = *Geochelone denticulata*; GoAg = *Gopherus agassizii*; HomAreo = *Homopus areolatus*; MalTon = *Malacochersus tornieri*; Man Em = *Manouria emys*; TG = *Testudo graeca*; TGG = *Testudo graeca graeca*; TH = *Testudo hermanni*; TK = *Testudo kleinmanni*; TM = *Testudo marginata*;

weitere Abkürzungen: k.A.= keine Angaben; k.w.A. = keine weiteren Angaben; URTD = Upper respiratory tract disease; LRTD = Lower respiratory tract disease.

Im Laufe der Jahre konnten die unterschiedlichsten Erkrankungen der Landschildkröten in Zusammenhang mit einer Herpesinfektion gebracht werden. Der Stomatitis-Rhinitis-Komplex der Landschildkröte nimmt hierbei eine besonders wichtige Rolle ein (JACOBSON et al., 1986; COOPER et al., 1988; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; LANGE et al., 1989; MÜLLER et al., 1990; PETTAN et al., 1991; BIERMANN und BLAHAK, 1993; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; PETTAN-BREWER et al., 1996; MARSCHANG et al., 1997a; MURO et al., 1998; DRURY et al., 1999a;



KÜBBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 1999b; MARSCHANG, 1999a; UNE et al., 1999; BLAHAK, 2000b; SCHMIDT, 2000; TEIFKE et al., 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MARSCHANG et al., 2001b; MARTÍNEZ SILVESTRE et al., 2001; ORIGGI et al., 2001a ; ORIGGI et al., 2001b). Der Verlauf einer Infektion spielt sich in den meisten Fällen nach einem ähnlichen Muster ab. Häufig erfolgt vor Ausbruch der Erkrankung ein Neuzugang eines Tieres, welches ohne oder nur mit unzureichender Quarantäne in einen bis dahin gesunden Bestand kommt (BRAUNE et al., 1989; OETTLE et al., 1990; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; HÄFELI und SCHILDGER, 1995; MARSCHANG et al., 1997a; SCHMIDT, 2000). Meist erfolgt der Neuzusatz im Frühjahr oder Sommer nach dem Winterschlaf. Erste Krankheitssymptome stellen sich bei den bereits im Bestand befindlichen Tieren häufig bereits im Herbst ein (MARSCHANG, 1999b). Fast immer werden zunächst Verhaltensänderungen, Anorexie und Lethargie bemerkt (OETTLE et al., 1990). Augen- und Nasenausfluß bis hin zur manifesten eitrigen Rhinitis, Unruhe und Dyspnoe treten als weitere für den Besitzer auffällige Symptome dazu (DRURY et al., 1998; DRURY et al., 1999a; DRURY et al., 1999b; BLAHAK, 2000b). Die Dyspnoe, welche regelmäßig von pfeifenden Atemgeräuschen begleitet wird, äußert sich hierbei durch Maulatmung, rhythmisch durch die Vorderbeine verstärkte Atmung und durch vehementes Herausstrecken des Halses bis zum Überstrecken des Kopfes über den Rückenpanzer hinaus (MÜLLER et al., 1990; MURO et al., 1998; DRURY et al., 1999a; GABRISCH und ZWART, 2001). Bei der klinischen Untersuchung zeigt sich das Bild einer in den meisten Fällen diphtheroid-nekrotisierenden

Stomatitis und Pharyngitis. Diese Beläge führen bei Ablöseversuchen zu heftigen Blutungen und in vielen Fällen auch zu einer nachfolgenden Verlegung der Glottis (HARPER et al., 1982; BRAUNE et al., 1989; MÜLLER et al., 1990). Spätestens in diesem Stadium der Erkrankung kommt es zu massenhaften Todesfällen. In vielen Beständen zeigen die Tiere allerdings vor dem Verbringen in den Winterschlaf keinerlei für den Halter ersichtliche Krankheitserscheinungen. Hierbei kommt es während des Winterschlafes zu akuten Todesfällen (LANGE et al., 1989). Ein weiterer möglicher Verlauf der Herpesvirose führt erst nach der Hibernation zu Anorexie, Lethargie und darauffolgender Rhinitis und Stomatitis (HÄFELI und SCHILDGER, 1995; MURO et al., 1998; SCHMIDT, 2000). In einigen Fällen kann es auch zur Entwicklung zentralnervöser Symptome in Form von übermäßigem Speicheln und/oder unaufhörlichen Drehbewegungen kommen (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; BIERMANN, 1995). Auch WITTE (1993) beschreibt Torticollis bei einer herpesvirusinfizierten *Testudo hermanni* und Kreislaufen des Tieres bis zur vollständigen Erschöpfung als zentralnervöse Symptomatik. WENKER et al. (1997) berichten von einer Parese der Hintergliedmaßen nach vorangegangener Schnupfensymptomatik bei einer *Testudo hermanni boettgeri*. Auch weitere Autoren erwähnen eine Parese, bzw. eine Paralyse, der Hintergliedmaßen in Zusammenhang mit einer Herpesvirusinfektion bei Landschildkröten (OETTLE et al., 1990; DRURY et al., 1998 ; DRURY et al., 1999b; MCARTHUR, 2001). Enteritis wird bei einigen Autoren ebenso als einziges, bzw. als begleitendes Krankheitssymptom der Herpesvirusinfektion beschrieben (BRAUNE et al., 1989; LANGE et al., 1989; WITTE und BLAHAK,

1993; KABISCH und FROST, 1994; BLAHAK, 2000b; GABRISCH und ZWART, 2001). PETTAN-BREWER berichtet 1991 und 1996 von einer Verstopfung des Colons bei einer *Gopherus agassizii* (PETTAN et al., 1991; PETTAN-BREWER et al., 1996). MARSCHANG erwähnt eine Schwellung an Hals und Unterkiefer der erkrankten Tiere (MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 1999b). TEIFKE et al. (2000) beschreiben von der Mandibula bis zum Thorax reichende subkutane Ödeme. MURO et al. (1998) berichten 1998 von ausgeprägter Sialorrhoe, Ulzera an den Extremitäten, Blepharitis und Konjunktivitis bei einigen der erkrankten Schildkröten. Auch MARSCHANG et al. (1997a) beschreiben 1997 das Bild einer ausgeprägten Konjunktivitis. DRURY et al. (1998; 1999b) und MCARTHUR (2001) berichten von einer lymphoproliferativen Erkrankung der Landschildkröten in Zusammenhang mit einer Herpesvirusinfektion. Auch äußerlich zunächst klinisch unauffällige Tiere können Virusträger und Ausscheider sein und damit eine große Gefahr für eine gesamte Population als latente Überträger darstellen (HARPER et al., 1982; JACOBSON et al., 1985; MÜLLER et al., 1990; HÄFELI und SCHILDGER, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997b; BLAHAK, 2000b; HERVAS et al., 2002).

#### **2.2.2.2.2 Übertragung**

Der Übertragungsmodus des Herpesvirus ist noch nicht vollständig geklärt, eine horizontale Transmission kann aber als gesichert angesehen werden (MÜLLER et al., 1990; BIERMANN, 1995; MARSCHANG, 1999b; SCHMIDT, 2000; TEIFKE et al., 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MARTÍNEZ SILVESTRE et al., 2001; MCARTHUR, 2001). Speichel und Nasensekret (MÜLLER et al.,

1990; MARSCHANG, 1999b) und Kot (LANGE et al., 1989) kommen als mögliche Übertragungsmedien in Betracht. MÜLLER et al. (1990) berichten von einer eventuellen Virusausscheidung über Urin und Tränenflüssigkeit. Die Aufnahme des Virus erfolgt vermutlich auf oro-nasalem Weg (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; DRURY et al., 1999b; UNE et al., 1999). HELDSTAB und BESTETTI (1989) vermuten die Eintrittspforte des Virus in der Maulhöhle, da dort die Läsionen zuerst auftreten. UNE et al. (1999) berichten von dem Auftreten einer Herpesviruserkrankung bei Spaltenschildkröten (*Malacochersus tornieri*) nach Besatz eines Geheges, in welchem zuvor an Herpesvirose erkrankte Russische Steppenschildkröten (*Testudo (Agrionemys) horsfieldii*) untergebracht gewesen waren. Auch eine Übertragung über das Blut erscheint durchaus denkbar, da Herpesviren aus peripheren Leukozyten isoliert werden konnten (MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 1999b). Laut MARSCHANG (1999b) ist allerdings nicht klar, ob es sich hierbei um eine zellgebundene Virämie handelt oder ob sich das Virus frei im Blut befindet.

Eine vertikale Transmission konnte bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, scheint aber möglich. Hierfür spricht der Nachweis von intranukleären Einschlusskörperchen in den Epithelzellen des Ductus deferens der Hoden (MÜLLER et al., 1990) bzw. dem Epithel des Ovidukts (MARSCHANG, 1999b) von Schildkröten im Verlauf einer Herpesvirusinfektion.

Die Henle-Kochschen Postulate konnten bis heute für die Herpesviren der Schildkröten noch nicht vollständig erfüllt werden. In einer Studie von ORIGGI et al. (2001b) wird eine Herpesvirusinfektion bei *Testudo graeca* durch

intramuskuläre Injektion oder intranasale Verabreichung zweier Herpesvirusisolate ausgelöst. Zwei der vier infizierten Tiere entwickelten ungeachtet des Infektionsweges und des verwendeten Virusisolates Läsionen der Maulschleimhaut gleicher Morphologie und Lokalisation.

### 2.2.2.2.3 Diagnostik

Auskunft über Nachweismethoden der Herpesviren bei Landschildkröten gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Nachweismethoden und weiterführende Untersuchungen der Herpesviren bei Landschildkröten

Autoren/Jahr	Histo	EK	EM	Isolat	CPE	Charakt.	Sero	PCR/Restr.
HOLT und COOPER, 1976	ja	k.A.	k.A.	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
HARPER et al., 1982	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
JACOBSON et al., 1985	ja	ja	ja	GSTF n.g.	25° nein	n.d.	n.d.	n.d.
COOPER et al., 1988	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
HELDSTAB und BESTETTI, 1989	ja	ja	ja	nein	nein	n.d.	n.d.	n.d.
LANGE et al., 1989	ja	ja	ja	TEC n.g.	30° nein	n.d.	n.d.	n.d.
BRAUNE et al., 1989	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
MÜLLER et al., 1990	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
OETTLE et al., 1990	ja	ja	k.A.	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
PETTAN et al., 1991	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
BIERMANN und BLAHAK, 1993	ja	ja	k.A.	THC ja	28° ja	n.d.	n.d.	n.d.
KABISCH und FROST, 1994	ja	ja	ja	TEC ja	28° ja	EM Isolate	NT 26°	n.d.
BIERMANN, 1995	ja	ja	ja	THC ja HEF nein	28° ja	Chloro, IUDR, pH, Filtr, Temp, EM, Vermkinetik	NT 28° KNT	n.d.
PETTAN-BREWER et al., 1996	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.

Autoren/Jahr	Histo	EK	EM	Isolat	CPE	Charakt.	Sero	PCR/Restr.
MARSCHANG et al., 1997a	nein	ja	ja	THC ja HEF nein	28° ja	Chloro, IUDR, HA, EM Verm.kurve, Virostatika	NT 28°	Restr.analys.
MARSCHANG et al., 1997b	k.A.	k.A.	k.A.	THC ja	28° ja	EM, IUDR, Virostatika	k.A.	Restr.analys.
POSTHAUS et al., 1997	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
WENKER et al., 1997	ja	ja	k.A.	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
FROST und SCHMIDT, 1997	k.A.	k.A.	k.A.	TEC ja	28° ja	n.d.	NT 28°	n.d.
DRURY et al., 1998	ja	ja	ja	CAM n.g.	31°, 37° nein	n.d.	n.d.	n.d.
MURO et al., 1998	ja	ja	ja	n.d.	nein	n.d.	n.d.	n.d.
MARSCHANG et al., 1999	ja	ja	ja	THC ja	?° ja	Chloro, IUDR, EM	NT	Restr.analys.
MARSCHANG, 1999	ja	k.A.	ja	THC ja HEF nein	28° ja	Chloro, IUDR, EM	NT 28°	Restr.analys.
KÜBBER-HEISS et al., 1999	ja	ja	ja	HEF n.g.	28° ggr.	n.d.	n.d.	n.d.
UNE et al., 1999	ja	ja	ja	k.A.	nein	n.d.	n.d.	nested PCR (Formalin)
DRURY et al., 1999a	k.A.	ja	ja	THC ja	28° ja	EM Isolate	n.d.	n.d.
DRURY et al., 1999b	ja	ja	ja	THC ja	28° ja 31°nein	EM Isolate	n.d.	n.d.
ORIGGI und JACOBSON 1999	k.A.	k.A.	k.A.	als AG	k.A.	n.d.	NT, IP ELISA	n.d.
SCHMIDT, 2000	ja	ja	ja	TEC ja	28° ja	EM Isolate	NT 28°	n.d.
ORIGGI et al., 2000	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	n.d.	NT, ELISA	n.d.
TEIFKE et al., 2000	ja	ja	ja	THC ja	28° ja	Chloro, IUDR,EM	n.d.	Sequenzier. PCR, ISH
BLAHAK, 2000	k.A.	ja	ja	k.A.	k.A.	k.A.	ja	n.d.
MARTINEZ-SILVESTRE, 2001	ja	ja	ja	THC nein	nein	n.d.	NT 28°	PCR (Formalin)
Mc ARTHUR, 2001	ja	ja	ja	THC nein	31° nein	n.d.	n.d.	n.d.
MARSCHANG, 2001a	k.A.	k.A.	ja	THC ja	28° ja	Chloro, IUDR,EM	NT 28°	Restr.analys.
MARSCHANG, 2001b (DTW)	k.A.	k.A.	ja	THC ja	28° ja	Chloro, IUDR,EM	NT 28°	n.d.
ORIGGI et al., 2001a	k.A.	k.A.	ja	THC nein	28° ja	EM Isolate	ELISA NT	Immunoblot
ORIGGI et al., 2001b	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	nein	n.d.	ELISA NT, IP	PCR, RT-PCR
HERVAS, 2002	ja	ja	ja	k.A.	nein	n.d.	n.d.	n.d.

Histo: Histologische Befunde

EK: Einschlußkörperchen

EM: Elektronenmikroskopische Untersuchung von betroffenem Gewebe

Isolat: zur Anzucht verwendete Zellen: CAM = Chorioallantois-Membran SPF Huhn; GSTF = Green sea turtle fibroblasts; HEF = Hühner Embryo Fibroblasten; TEC = Turtle embryo cells; THC = Turtle heart cells

CPE: zytopathischer Effekt; ° = Bebrütungstemperatur in °C

Charakt.: Charakterisierung der Isolate; Chloro = Chloroformempfindlichkeit; EM = Elektronenmikroskopische Untersuchung der Isolate; Filtr = Filtrationsversuche; HA = Hämagglutination; IUDR = Empfindlichkeit gegen IUDR; Temp = Thermostabilität; Verm.kin = Vermehrungskinetik; Verm.kurve = Vermehrungskurve; Virosta = Empfindlichkeit gegenüber Virostatika in der Zellkultur

Sero: Serologische Untersuchungen; ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay; IP = Immunoperoxidase Test; KNT = Kreuzneutralisationstest mit Kaninchenserum; NT = Neutralisationstest; ° = Bebrütungstemperatur in °C

PCR/Restr: Immunoblot = Immunoblotting; ISH = In situ Hybridisierung; PCR = Polymerasekettenreaktion; Restr.analys. = Restriktionsenzymanalyse; RT-PCR = Reverse Transkriptions Polymerasekettenreaktion; Sequenzier. = Sequenzierung des UL5-Genes

weitere Abkürzungen: k.A. = keine Angaben; n.d. = nicht durchgeführt; n. g. = nicht gelungen; z.T. = zum Teil.

Bis 1993 erfolgte die Diagnosestellung der Herpesvirusinfektion ausschließlich über das klinische Bild, pathologisch-anatomische und histologische Befunde und den elektronenmikroskopischen Nachweis des Virus. Zu den am häufigsten genannten pathohistologischen Veränderungen zählt eine diphtheroid-nekrotisierende Entzündung der kutanen Schleimhäute von Maulhöhle und Schlund, wobei Epithel nur noch in inselförmigen Bereichen erhalten ist. Beläge bestehen laut BRAUNE et al. (1989) aus Fibrin, nekrotischen Zellen und einem dichten Bakterienrasen an ihrer Oberfläche. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um diverse Bakterien, die häufig zur Normalflora der Maulhöhle

gehören oder als fakultativ pathogene Keime angesehen werden (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; LANGE et al., 1989; MÜLLER et al., 1990; OETTLE et al., 1990; POSTHAUS et al., 1997; MCARTHUR, 2001). In vielen Fällen lassen sich auch gar keine Bakterien nachweisen (DRURY et al., 1998; HERVAS et al., 2002). JACOBSON et al. (1985) beschreiben die Infiltration der Mukosa mit unterschiedlichen Entzündungszellen wie Heterophile, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in den diffusen Bereichen der Nekrose. Auch weisen viele Tiere weiterhin eine Ösophagitis auf (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; MÜLLER et al., 1990). JACOBSON et al. (1985) erwähnen zusätzlich tiefgehende Läsionen der Schleimhäute der Nasenhöhlen; MURO et al. (1998) berichten von einer unspezifischen Entzündung der Nasenschleimhäute und der Existenz von seromukösem Sekret in den Nasenhöhlen nach longitudinaler Transsektion des Schädels. In der Trachea fallen BRAUNE et al. (1989) umschriebene Bereiche auf, in denen eine Auflockerung des Zellverbandes stattgefunden hat. PETTAN-BREWER et al. (1996) beschreiben neben der Verdickung des Trachealepithels auch eine Ansammlung von käsigem Material im Lumen der Trachea, welches sich bis in die Primärbronchi und das pulmonale Parenchym ausbreitet. MURO et al. (1998) diagnostizieren mit zähem Sekret verlegte Nasenhöhlen und obere Luftwege, emphysematöse Lungenbereiche und bei mehreren Tieren eine katarrhalische purulente Bronchopneumonie. Bei dieser Studie ist besonders auch die nekrotisierende Rhinotracheitis bei einigen Tieren zu erwähnen, die gleichzeitig mit Glossitis und Stomatitis im Zuge einer Herpesvirusinfektion auftritt. MÜLLER et al. (1990) beschreiben eine Fibrose der Lunge und ein bullöses Emphysem in den



Marginalbereichen der Lunge. Auch konnten PETTAN et al. (1991) eine extensive proliferative und ulzerative Tracheobronchitis mit diffusen Granulomen im Lungenparenchym einer *Gopherus agassizii* feststellen. Sowohl MARSCHANG (1999b), als auch SCHMIDT (2000) diagnostizieren eine Pneumonie bei einigen gestorbenen Tieren. HERVAS et al. (2002) beschreiben eine disseminiert mit weißen millimetergroßen Herden durch- und überzogene, vergrößerte Leber als einziges makroskopisch auffälliges Merkmal einer Herpesinfektion bei einer *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*. Histologisch stellen HERVAS et al. (2002) in diesem Fall lediglich eine multifokale nekrotisierende Hepatitis fest, während alle anderen Organe keinerlei deutliche histologische Veränderungen zeigen. Nekrosen der Leber wurden auch von anderen Autoren erwähnt (KÜBBER-HEISS et al., 1999). Eine Meningoencephalitis mit Trübung und Ödem der Leptomeningen nennen HELDSTAB und BESTETTI (1989) als weitere pathohistologische Veränderung im Zuge einer Herpesvirusinfektion bei einer *Testudo hermanni*. In einem Fall beschreiben MÜLLER et al. (1990) eine multifokale Gliose und ein Status spongiosus des Diencephalons. WENKER et al. (1997) beschreiben eine nicht-eitrige nekrotisierende Meningomyelitis mit multifokal hochgradigen perivaskulär akzentuierten mononukleären Infiltraten in grauer und weißer Substanz und in den Meningen des Rückenmarks. Hierbei stellen die Autoren auch Nekrosen von Neuronen und Ependymzellen sowie einen Status spongiosus der weißen Substanz mit multiplen geschwollenen Axonen im Rückenmark fest.

Zum Teil können bei einer bestehenden Herpesvirusinfektion homogene, eosinophile bis basophile, meist intranukleäre Einschußkörperchen vom Typ

Cowdry A nachgewiesen werden. Diese amorphen Gebilde werden besonders deutlich in der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und können den Zellkern soweit ausfüllen, daß das Kernchromatin marginal verdrängt wird und so ein deutlicher Halo entsteht (HARPER et al., 1982; JACOBSON et al., 1985; PETTAN-BREWER et al., 1996; KÜBBER-HEISS et al., 1999). JACOBSON et al. (1985), POSTHAUS et al. (1997) und MURO et al. (1998) weisen zusätzlich auch intrazytoplasmatische Einschußkörperchen in den veränderten Organbezirken nach. Intranukleäre Einschußkörperchen findet man regelmäßig in den Zentren der nekrotischen Bezirke der Maul- und Rachenschleimhaut und am Übergang zum unverändertem Gewebe im Randbereich der Läsionen (HARPER et al., 1982; JACOBSON et al., 1985; COOPER et al., 1988; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; MÜLLER et al., 1990; PETTAN et al., 1991; BIERMANN und BLAHAK, 1993; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; PETTAN-BREWER et al., 1996; POSTHAUS et al., 1997; WENKER et al., 1997; MARSCHANG et al., 1998; MURO et al., 1998; KÜBBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 1999b; UNE et al., 1999; SCHMIDT, 2000; TEIFKE et al., 2000; MARTÍNEZ SILVESTRE et al., 2001). Auch im Ösophagus können viele Autoren intranukleäre Einschußkörperchen nachweisen (MÜLLER et al., 1990; OETTLE et al., 1990; BIERMANN und BLAHAK, 1993; BIERMANN, 1995; POSTHAUS et al., 1997; MARSCHANG, 1999b; UNE et al., 1999). MÜLLER et al. (1990), POSTHAUS et al. (1997), MARSCHANG (1999b) und UNE et al. (1999) beschreiben intranukleäre Einschußkörperchen ebenso im Magen. Auch im Darmepithel diagnostizieren verschiedene Autoren Einschlüsse (LANGE et al., 1989; POSTHAUS et al., 1997; UNE et al., 1999;

TEIFKE et al., 2000). Ebenso lassen sich diese in der Leber (MÜLLER et al., 1990; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; POSTHAUS et al., 1997; KÜBBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 1999b; UNE et al., 1999; SCHMIDT, 2000; HERVAS et al., 2002) , in der Milz (MÜLLER et al., 1990; UNE et al., 1999), in der Niere (MÜLLER et al., 1990; UNE et al., 1999; TEIFKE et al., 2000), im Pankreas (UNE et al., 1999) und in der Nebenniere (UNE et al., 1999) darstellen. Im Respirationstrakt gelingt es häufig, ebenfalls herpesvirustypische intranukleäre Einschlußkörperchen nachzuweisen. MURO et al. (1998) und TEIFKE et al. (2000) finden diese in der Nase; MÜLLER et al. (1990), WENKER et al. (1997), UNE et al. (1999) und MARTINEZ SILVESTRE et al. (2001) im Larynxbereich. Etliche Autoren beschreiben Einschlüsse in der Trachea (BRAUNE et al., 1989; MÜLLER et al., 1990; PETTAN et al., 1991; BIERMANN und BLAHAK, 1993; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; PETTAN-BREWER et al., 1996; POSTHAUS et al., 1997; MURO et al., 1998; MARSCHANG, 1999b; UNE et al., 1999; TEIFKE et al., 2000; MARTÍNEZ SILVESTRE et al., 2001). In den Bronchien weisen COOPER et al. (1988), HELDSTAB und BESTETTI (1989) und PETTAN-BREWER (1996) diese nach; MURO et al. in den Alveolen (1998). Weitere Literaturquellen beschreiben diese in Arealen der Lunge allgemein (MÜLLER et al., 1990; PETTAN et al., 1991; POSTHAUS et al., 1997; KÜBBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 1999b; UNE et al., 1999; TEIFKE et al., 2000). Auch im Gehirn lassen sich Einschlüsse darstellen (COOPER et al., 1988; MÜLLER et al., 1990; KABISCH und FROST, 1994; POSTHAUS et al., 1997; WENKER et al., 1997; KÜBBER-HEISS et al., 1999; UNE et al., 1999; SCHMIDT, 2000; TEIFKE

et al., 2000). Im Rückenmark können diese nur von WENKER et al. (1997) und POSTHAUS et al. (1997) nachgewiesen werden. TEIFKE et al. (2000) gelingt der Nachweis auch im Neuron eines myenterischen autonomen Ganglions des Darmes einer *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*. MÜLLER et al. (1990) beschreiben das Vorkommen herpesvirustypischer intranukleärer Einschlußkörperchen in Ductus deferens, Tränen- und Speicheldrüse; MARSCHANG (1999b) hingegen im Eileiter einer Landschildkröte.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Mukosaarealen, in denen lichtmikroskopisch Einschlußkörperchen nachweisbar sind, werden häufig Nukleokapside im Kern (87-100 nm) und Virionen mit Envelope im Zytoplasma (110-120 nm) gefunden (MÜLLER et al., 1990). Tabelle 4 gibt unter anderem Auskunft über den gelungenen elektronenmikroskopischen Nachweis der Herpesvirionen bei diversen Autoren. Meist handelt es sich hierbei um intranukleär gelegene ikosaedrische Nukleokapside mit deutlicher Oberflächenstruktur und einer Größe von 90-120 nm. HARPER et al. (1982) beschreibt sowohl das Vorkommen leerer Kapside als auch unbehüllter Partikel. LANGE et al. (1989) gelingt der Nachweis von Herpesviruspartikeln an konzentrierten und negativ kontrastierten Darminhaltsproben aus *Testudo hermanni* und *Testudo (Agrionemys) horsfieldii* mittels direkter Elektronenmikroskopie. Die elektronenmikroskopisch erhobenen Befunde, wie Morphologie, Größe, Erscheinen unreifer unbehüllter Viruspartikel in Kerneinschlüssen und Auftreten behüllter reifer Virionen im Zytoplasma, erlauben in den meisten Fällen eine recht gesicherte Zuordnung der dargestellten Viren zur Familie der *Herpesviridae*. TEIFKE et al. (2000) kloniert

und sequenziert einen Abschnitt des hochkonservierten UL5-Gens. Mittels PCR synthetisieren TEIFKE et al. eine Digoxigenin-markierte DNS-Sonde und wenden diese anschließend in der in-Situ-Hybridisierung an Formalin-fixiertem Gewebe erkrankter oder infizierter Schildkröten an.

Auch am lebenden Tier scheint in einigen Fällen die Darstellung der Einschlusskörperchen zur Diagnosestellung der Herpesvirusinfektion möglich. Hierbei stellt die Untersuchung eines mit Giemsa oder Hämatoxylin-Eosin angefärbten Zungenabklatschpräparates, bzw. eines entsprechend gefärbten Schleimhautabstriches der Zungenveränderungen eine weitere Nachweismethode der Herpesvirose dar (HÄFELI und SCHILDGER, 1995; GABRISCH und ZWART, 2001). MÜLLER et al. (1990) gelingt der Nachweis intranukleärer Einschlusskörperchen im Zungenabklatschpräparat bei erkrankten Landschildkröten. DRURY et al. (1999a; 1999b) beschreiben den Nachweis intranukleärer Einschlusskörperchen im gefärbten Maulhöhlenabstrich einer mit Herpesvirus infizierten *Testudo graeca*. ORIGGI et al. (2001a) berichten von der Polymerasekettenreaktion veränderter Gewebe infizierter Landschildkröten als weitere Nachweismethode der Herpesvirusinfektion.

Etliche Versuche der Herpesvirusisolierung bei der Landschildkröte scheitern (JACOBSON et al., 1985; LANGE et al., 1989). BIERMANN und BLAHAK (1993) beschreiben die Erstisolierung aus Gehirn, Darm, Lunge und Trachea einer herpesvirusinfizierten *Testudo hermanni*. Nahezu zeitgleich isolieren KABISCH und FROST (1994) erfolgreich das Herpesvirus aus Gehirn, Leber und Milz von *Testudo hermanni* und *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*. Weiteren

Autoren gelingt die Isolierung von Herpesviren aus den verschiedenen Organen (BIERMANN, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG et al., 1997b; DRURY et al., 1999a; DRURY et al., 1999b; MARSCHANG, 1999b; MARSCHANG, 1999a; SCHMIDT, 2000; TEIFKE et al., 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MARSCHANG et al., 2001b). Lediglich zwei Zellsysteme der Schildkröten finden zur Ausbildung eines durch Viren ausgelösten zytopathischen Effektes Verwendung. JACOBSON et al. (1985) unternimmt den erfolglosen Versuch einer Anzucht auf Fibroblasten einer *Chelonia mydas* (GSTF = Green sea turtle fibroblasts) bei einer Temperatur von 25°C; LANGE et al. (1989) mißlingt die Anzucht auf primären embryonalen Schildkrötenzellkulturen (TEC = Turtle embryo cells) bei 30°C Bebrütungstemperatur. Schildkrötenherzzellen (THC = Turtle heart cells) werden von vielen Autoren bei 28°C Bebrütungstemperatur erfolgreich zur Isolierung des Herpesvirus verwendet (BIERMANN und BLAHAK, 1993; BIERMANN, 1995; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG et al., 1997b; DRURY et al., 1999a; DRURY et al., 1999b; MARSCHANG, 1999b; MARSCHANG, 1999a; TEIFKE et al., 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MARSCHANG et al., 2001b). Auch auf primären Schildkrötenzellkulturen (TEC = Turtle embryo cells) bei 28°C Bebrütungstemperatur gelingt die Isolierung des Herpesvirus (KABISCH und FROST, 1994; FROST und SCHMIDT, 1997; SCHMIDT, 2000). Neben der Isolation des Virus aus den unterschiedlichsten Organen bei den verschiedenen Autoren gelingt FROST und SCHMIDT (1997) die Isolierung des Herpesvirus aus Rachenabstrichen zweier Landschildkröten. SCHMIDT (2000) isoliert erfolgreich Herpesviren aus den

Mundhöhlenabstrichen einer *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* und *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*. Außerdem gelingt MARSCHANG (1999b), bzw. MARSCHANG et al. (1997a; 2001a) die Isolierung des Herpesvirus aus Rachentupfern und/oder peripheren Leukozyten.

KABISCH und FROST (1994); BIERMANN (1995); MARSCHANG et al. (1997a; 1997b; 1999b; 1999a; 2001a; 2001b); DRURY et al. (1999a; 1999b); TEIFKE et al. (2000) und SCHMIDT (2000) verwenden die elektronenmikroskopische Untersuchung der Isolate als zusätzliches Charakterisierungsmerkmal (Tabelle 4). Eine weiterführende Charakterisierung der Isolate erfolgt bei BIERMANN (1995), MARSCHANG (1999b; 1999a), MARSCHANG et al. (MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG et al., 2001a; MARSCHANG et al., 2001b) und TEIFKE et al. (2000) durch Überprüfung der Isolate auf Empfindlichkeit gegenüber Chloroform und etwaige Inhibierung des zytopathischen Effektes durch IUDR. Zusätzlich erfolgt eine Charakterisierung der Herpesvirusisolate bei BIERMANN (1995) durch Vermehrungsversuche der Isolate in unterschiedlichen Zellkulturen, Filtrationsversuche und Untersuchungen der Vermehrungskinetik, pH- und Thermostabilität. MARSCHANG et al. (1997a) können keine Hämagglutination von Hühnererythrozyten feststellen. Zusätzlich wird in dieser Studie eine Vermehrungskurve und Überprüfung der Empfindlichkeit gegenüber Virostatika (Aciclovir, Ganciclovir) in vitro durchgeführt. In weiteren Publikationen von MARSCHANG et al. (1997b; 1999a; 2001a) und in der Dissertation von MARSCHANG (1999b) erfolgt die Charakterisierung der Herpesvirusisolate durch Restriktionsenzymanalyse. UNE et al. (1999; 2000) und MARTINEZ

SILVESTRE (2001) beschreiben die Durchführung einer Polymerasekettenreaktion mit formalinfixierten Gewebeproben infizierter Schildkröten.

Serologische Untersuchungen als Methodik der Wahl für größere Bestandskontrollen werden von verschiedenen Autoren beschrieben. So führen einige Autoren Neutralisationstests mit unterschiedlichen Schildkrötenisolaten bei einer Temperatur zwischen 26 und 28°C durch. Hierbei wird sowohl ein Vergleich unterschiedlicher Schildkrötenherpesvirusisolate durchgeführt (BIERMANN, 1995), als auch zusätzlich Isolate verschiedener Vögel und Schildkröten (MARSCHANG et al., 1997b; MARSCHANG, 1999b) verglichen (KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 1999b; MARSCHANG, 1999a; ORIGGI und JACOBSON, 1999; ORIGGI et al., 2000; SCHMIDT, 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MARSCHANG et al., 2001b; MARTÍNEZ SILVESTRE et al., 2001; ORIGGI et al., 2001a; ORIGGI et al., 2001b). BIERMANN (1995) führt in seiner Dissertation Kreuzneutralisationstests von Isolaten unterschiedlicher Schildkröten mit Hilfe von Seren zuvor mit diesen Isolaten immunisierten Zwergkaninchen durch. ORIGGI et al. publizieren einen ELISA zum Antikörpernachweis herpesvirusinfizierter Schildkröten und vergleichen dessen Ergebnisse mit denen des Neutralisationstests (ORIGGI und JACOBSON, 1999; ORIGGI et al., 2000; ORIGGI et al., 2001a; ORIGGI et al., 2001b).



#### **2.2.2.2.4 Therapie und Kontrolle**

Die Therapie der Herpesvirose der Landschildkröte unterliegt noch keinem einheitlichen Protokoll. Diverse Autoren empfehlen den Einsatz von antimikrobieller und unterstützender Therapie der erkrankten Tiere. HOLT und COOPER (1976) verabreichen Oxytetracyclin ohne sichtbaren Erfolg, JACOBSON et al. (1985) geben Gentamicin, ohne damit eine Wirkung zu erzielen. LANGE et al. (1989) unternehmen einen erfolglosen Therapieversuch mit diversen Antibiotika und Antiparasitika; OETTLE et al. (1990) verwenden Chloramphenicol und Amikacin. BIERMANN (1995) berichtet von einem Behandlungsansatz mit Enrofloxacin, Terramycin und Wasserstoffperoxid lokal, der ebensowenig zum Erfolg führt. Auch die von PETTAN-BREWER et al. (1996) unternommene Therapie mit Infusionen, Trimethoprim-Sulfonamid und Nystatin kann das Sterben des infizierten Tieres nicht entgegenwirken. WENKER et al. (1997) berichten von einer erfolglosen symptomatischen Therapie mit Kortikosteroiden und Vitamin B-Komplex. Die von SCHMIDT (2000) beschriebene systemische Enrofloxazin- und lokale Nystatingabe führen genauso wenig zum gewünschten Erfolg wie die intramuskuläre Injektion von Enrofloxacin oder Ceftazidimin in Kombination mit Flüssigkeitsgaben und Fütterung der Tiere per Magenschlundsonde bei MCARTHUR (2001).

Die bei Reptilien angewandte antivirale Therapie ist bisher noch nicht in ausreichender Form überprüft worden. Standardisierte und aussagekräftige Testverfahren wurden bis dato noch nicht durchgeführt, allerdings geben verschiedene Autoren eine orale Aciclovir-Dosis von 80 mg/kg/Tag als effektive Therapiemöglichkeit an (FRYE, 1991; KLINGENBERG, 1996; SCHUMACHER,

1996; EGGENSCHWILER, 2000; CARPENTER et al., 2001). COOPER et al. (1988) beschreiben erste Therapieerfolge bei der topischen Anwendung fünfprozentiger Aciclovirsalbe bei an Stomatitis erkrankten Tieren. Auch andere Autoren empfehlen die tägliche Anwendung dieser Salbe als unterstützende Therapie (FRYE, 1991; 1995; KLINGENBERG, 1996; CARPENTER et al., 2001). Sowohl HÄFELI und SCHILDGER (1995) als auch GABRISCH und ZWART (2001) schreiben dem Einsatz von Aciclovirsalbe keinen Therapieerfolg zu. Diese Autoren empfehlen wie auch KÖHLER (1996) und BLAHAK (2000b) statt dessen unterstützende Maßnahmen wie Flüssigkeitsgabe, Zwangsfütterung, Wärme, Antibiotika, Antimykotika und Antiparasitika. Auch die Gabe von Paramunitätsinducern und Toilette von Maulhöhle und Larynx werden hierbei als unterstützende Therapie aufgeführt.

MARSCHANG et al. (1997a; 1997b) gelingt der Nachweis der antiviralen Wirksamkeit von Aciclovir und Ganciclovir in vitro. Hiernach führt Aciclovir in einer Konzentration von 25 µg/ml zur Reduktion der Virusreplikation in der infizierten Zellkultur, bei einer Konzentration von 50 µg/ml läßt sich kein Virustiter mehr nachweisen. Ganciclovir verhindert nach MARSCHANG et al. (1997a; 1997b) schon in einer Konzentration von 25 µg/ml komplett die meßbare Virusreplikation in vitro. Somit können diese Substanzen eventuell nützliche Medikamente in der Behandlung der Herpesvirose darstellen, die Überprüfung ihrer Wirksamkeit in vivo steht allerdings noch aus.

Erste Versuche der Vakzination wurden von MARSCHANG et al. (2001b) in einer chronisch mit Herpesviren infizierten Population in Italien mit einer

selbsthergestellten Inaktivatvakzine durchgeführt. Trotz dreimaliger Impfung im 45-tägigen Abstand konnte bei den so präparierten Tieren kein signifikanter Anstieg neutralisierender Antikörper im Blut festgestellt werden. Neben vielen anderen Autoren empfehlen GABRISCH und ZWART (2001) und HÄFELI und SCHILDGER (1995) die unbedingt einzuhaltende Quarantäne bei Neuzugängen und eine Trennung der unterschiedlichen Landschildkrötenarten als sicherste Form der Prophylaxe einer Herpesvirusinfektion. Laut BLAHAK (2000b) sollte in jedem Falle eine Untersuchung des Zukauffieres auf Herpesvirus-neutralisierende Antikörper durchgeführt werden. SCHMIDT (2000) empfiehlt hierbei wiederholte Testungen der Tiere nach 6 Wochen und nach überstandem Winterschlaf.

## **2.3 Weitere Ursachen für Krankheiten des oberen Respirations- und Digestionstraktes der Schildkröten**

Neben Mykoplasmen und Herpesviren gibt es bei der Schildkröte noch andere Auslöser von Erkrankungen des Atmungs- und oberen Verdauungstraktes. Sowohl infektiöse wie auch nichtinfektiöse Ursachen kommen als Differentialdiagnosen bzw. als Wegbereiter oder die klinische Erkrankung verstärkende Sekundärinfektionen in Betracht. Zu den infektiösen Erregern zählen Parasiten, Pilze, Bakterien und diverse Viren, zu den nichtinfektiösen Ursachen sind Haltungsfehler, Mangelkrankungen und Traumata zu rechnen. Ebenso können Tumore sekundäre Erkrankungen des Respirations- und Digestionstraktes zur Folge haben.

## 2.3.1 Infektiöse Ursachen

### 2.3.1.1 Parasiten

Laut COOPER und SAINSBURY (1994) sind Nematoden (Rhabdias, Entomelas und Kalicephalus), die Ödeme und Entzündungen in Maulhöhle und Ösophagus auslösen können, vor allem bei Schlangen und Echsen zu finden. Parasiten der Maulhöhle der Schildkröte finden bei den Autoren keine Erwähnung.

Parasiten des Respirationstraktes, wie sie bei anderen Reptilienspezies laut LANE und MADER (1996) häufiger zu finden sind, kommen bei den Landschildkröten eher selten vor. Pentastomiden findet man vereinzelt im Atmungstrakt von Wasserschildkröten (MARCUS, 1977; JUNGE und MILLER, 1992; LANE und MADER, 1996). FRANK (1985a) beschreibt die Besiedlung der Lunge und der Luftsäcke durch Pentastomiden (Zungenwürmer) und das mögliche Einwandern der Parasiten in die oberen Luftwege. Laut FRANK (1985a) kann sich ein starker Pentastomidenbefall durch vermehrte Schleimproduktion und deutliche Atemgeräusche auszeichnen. Spirorchidae (Trematoden) treten häufig bei Meeresschildkröten auf (JACOBSON, 1983) und können dort unter anderem Pneumonien hervorrufen (JACOBSON, 1997; ORIGGI und JACOBSON, 2000). Nicht selten sind laut FRANK (1985a) bei Schlangen und Schildkröten in Lunge und Trachea von Wildfängen Trematoden zu finden. REME (1980) berichtet bei juvenilen Suppenschildkröten (*Chelonia mydas*) in einer Aufzuchtstation auf der Insel Réunion von einer Infektion des oberen Digestionstraktes mit Protozoen. Die mikroskopisch nachweisbaren Flagellaten verursachen käsige Beläge auf der Zunge und in der gesamten Maulhöhle. Das dabei entstehende zähe Material dehnt sich zum Teil bis in den

Bereich der Glottis und des Ösophagus aus und ist mit einer Morbidität von 50-100 % bei 4-6 Wochen alten Meeresschildkröten verbunden. Die infizierten Tiere zeichnen sich durch Überstrecken des Halses, geöffnete Mundhöhle und stark forcierte Atmung aus (REME, 1980).

Bei den Landschildkröten liegen nur wenige Berichte über pulmonale Invasionen mit Parasiten vor. So können JACOBSON et al. (1994) bei einer Strahlenschildkröte (*Astrochelys radiata*) mit proliferativer Pneumonie intrazelluläre Kokzidien in alveolären Epithelzellen nachweisen.

### **2.3.1.2 Pilze**

MADER (1996) berichtet von durch Pilze ausgelösten Läsionen des oberen Verdauungstraktes. Laut COOPER und SAINSBURY (1994) wurden bereits verschiedene Pilzspezies bei der Stomatitis der Reptilien nachgewiesen. AUSTWICK und KEYMER (1981) erwähnen im Zusammenhang mit oralen Läsionen *Candida*, *Cladosporium*, *Trichosporon* und *Penicillium* spp. FRANK (1985a) berichtet von einer generalisierten Dematiaceae-Mykose einer Strahlenschildkröte (*Astrochelys radiata*) mit Unterkieferabszeß, Stomatitis und Anorexie. Bei diesem Tier können Fungi imperfecti der Familie Dematiaceae in Abszeßgewebe, Zunge, Lunge, Leber, Milz und Pankreas nachgewiesen werden.

Affektionen des Respirationssystemes oder der Haut von Reptilien mit *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Cladosporium* und *Rhizopus* spp. werden von JUNGE und MILLER (1992) aufgeführt.

Pilzinfektionen des Respirationstraktes, wie sie laut FERTARD (1987) bei Schlangen beschrieben werden, sind auch bei Landschildkröten vorzufinden. Bei einer Untersuchung von 200 gestorbenen Schildkröten konnte bei 3 % eine mykotische pulmonare Erkrankung festgestellt werden (siehe auch HUNT, 1957). ZWART und BUITELLAR (1980) berichten von einer *Candida tropicalis* Infektion bei einer Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) mit Anzeichen einer respiratorischen Erkrankung. JACOBSON (1980; 1997), JACOBSON et al. (1994) und ORIGGI und JACOBSON (2000) berichten von Pilzerkrankungen bei Galapagos- und Aldabra-Schildkröten. Bei den von diesen Autoren als Auslöser von Pneumonien aufgezählten Pilzen handelt es sich um *Aspergillus amstelodami*, *Geotrichum candidum*, Beauvaria oder Penicillium spp. bei diversen Galapagos-Schildkröten und um Infektionen mit *Paecilomyces fumoso-roseus* oder Aspergillus spp. bei den Aldabra-Schildkröten. Weiterhin findet die Isolation von *Penicillium lilacinum* aus der Lunge einer Waldschildkröte (*Geochelone denticulata*) Erwähnung (JACOBSON, 1994,1997; ORIGGI und JACOBSON, 2000). HOMER et al. (1998) weisen neben an Mykoplasmosen erkrankten Gopherschildkröten bei einem Tier mit Anzeichen einer Erkrankung des Atmungstraktes eine durch nicht näher differenzierte Pilzhyphen ausgelöste Pneumonie nach.

#### **2.3.1.3 Bakterien**

Ein Vergleich der Normalflora von freilebenden sowie in Gefangenschaft gehaltenen, gesunden und an respiratorischen Erkrankungen verstorbenen Schildkröten ergibt bei BOYER (1995) nur wenige Unterschiede der bakteriellen

Flora von Maulhöhle, Nase, Trachea, Lunge und Kloake. Zur Maulflora dieser Tiere zählen u.a. Koagulase-negative Staphylokokken, *Corynebacterium spp.*, *Providencia rettgeri*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides*, *Pseudomonas spp.* und *Pasteurella spp.* (BOYER, 1995). Eine offensichtliche Erkenntnis ist laut BOYER (1995) die Tatsache, daß viele potentiell pathogene Keime auch in gesunden Reptilien präsent sind und bei suboptimalen Umgebungsfaktoren zu opportunistischen Keimen avancieren können. Die folgende Aufzählung der bei erkrankten Reptilien isolierten Keime kann sich in weiten Teilen laut Boyer (1995) auch bei gesunden Tieren finden. Daher rät der Autor zu der Therapie des Patienten und nicht zur „Therapie“ eines Laborergebnisses.

Eine Bestätigung dieser These geben die Untersuchungen von STRAUB (2002). Die in dieser Studie durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen an 65 klinisch unauffälligen Landschildkröten zeigen eine Verschiebung der bakteriellen Besiedlung von Kornea, Rachen und Kloake vor und nach der Winterruhe. Zusätzlich konnte bei zehn der untersuchten Tiere nach dem Winterschlaf aus Rachen und/oder Kloake eine einzelne Bakterienart oder Bakteriengattung isoliert werden. Vor dem Winterschlaf war die Bakterienflora dieser Schildkröten eine Mischung aus multiplen Keimen. Trotz dieser massiven Veränderung der Keimflora blieben die Tiere auch nach Erwachen aus dem Winterschlaf klinisch unauffällig. Auch hier wäre daher die Einleitung einer Therapie ausschließlich aufgrund eines mikrobiologischen Befundes in Betracht auf die gute klinische Verfassung der Tiere kontraindiziert (STRAUB, 2002).

COOPER und SAINSBURY (1994) erwähnen Pseudomonaden und Aeromonaden sowie Mykobakterien als mögliche pathogene Keime in der Maulhöhle. Auch diese Autoren beschreiben viele Keime als Opportunisten, welche durch Streßfaktoren eine pathogene Wirkung entfalten können (COOPER und SAINSBURY, 1994). MADER (1996) gibt ebenso opportunistische Bakterien wie *Pseudomonas* und *Aeromonas spp.*, *Klebsiella* und *Salmonella spp.* als hauptverantwortliche Auslöser von Infektionen des oberen Digestionstraktes bei Reptilien an. SNIPES et al. (1980) weisen *Proteus vulgaris* in der Maulhöhle einer Wüstenschildkröte mit Stomatitis nach. Häufig in der oralen Flora bei in Gefangenschaft lebenden Wüstenschildkröten gefundene Keime sind laut SNIPES et al. (1980) Indol-positive hämolytische Pasteurellen (IPHP), die sowohl bei gesunden Wüstenschildkröten als auch bei solchen mit respiratorischer Erkrankung nachgewiesen werden können. REICHENBACH-KLINKE und ELKAN (1966) berichten von der Isolation von *Pasteurella haemolytica* aus einem Reptilienbestand mit ulzerativer Stomatitis. QUESENBERRY et al. (1986) weisen *Mycobacterium chelonae* bei einer *Boa constrictor* mit ulzerativer Stomatitis nach. FRANK (1985a) erwähnt bei nekrotisierenden Stomatitis die Gefahr der Ausbreitung der Prozesse bis in den Ösophagus.

Laut JUNGE und MILLER (1992) können bakterielle Pneumonien als Primärerkrankung auftreten oder sekundär neben anderen Ursachen durch Septikämien oder Aspiration infektiösen Materials bei nekrotischer Stomatitis ausgelöst werden. FRYE (1977) isoliert häufig *Aeromonas spp.*, *Proteus spp.* und *Pseudomonas spp.* im Zusammenhang mit Erkrankungen des



Atmungstraktes bei Reptilien. Laut FRANK (1985a) scheinen besonders Schlangen und Landschildkröten prädestiniert für Infektionen der Atemwege.

EVANS (1983) beschreibt eine chronische bakterielle Pneumonie bei zwei Dosenschildkröten (*Terrapene carolina carolina*). Histologisch kann sowohl eine chronische Entzündung in der Nasenhöhle als auch in der Lunge diagnostiziert werden. Eine Mischung aus gramnegativen Bakterien wie *Morganella morganii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Serratia marcescens* und *Pseudomonas* spp. werden bei beiden Tieren isoliert. Weder Viren, noch Protozoen oder Pilze können mittels Licht- oder Elektronenmikroskopie der Gewebeschnitte oder durch Isolationsversuche in vitro nachgewiesen werden. Vielmehr hält der Autor diese in großer Anzahl in den Läsionen vorkommenden und in vitro leicht anzüchtbaren gramnegativen Bakterien für die eigentlichen Auslöser der Pneumonie (EVANS, 1983). SCHRÖDER und SCHÜTT (1997) weisen bei einer Moschusschildkröte (*Sternotherus minor*) mit Hautveränderungen Mykobakterien in Lunge, Milz und Leber nach. Säurefeste Stäbchen können hierbei sowohl in den Organen als auch in den Hautveränderungen nachgewiesen werden. Eine eitrige Bronchopneumonie können VANROMPAY et al. (1994) aufgrund von *Chlamydia psittaci* bei Maurischen Landschildkröten feststellen. Die Autoren vermuten eine mögliche Ansteckung der beiden konfiszierten Tiere durch eine gemeinsame Unterbringung mit Psittaziden in einem Zoogeschäft (VANROMPAY et al., 1994). Eine von JACOBSON et al. (1991b) durchgeführte Untersuchung auf Chlamydien bei Wüstenschildkröten mit URTD verlief negativ.

Pasteurellen werden unter anderem als Ursache respiratorischer Erkrankungen der Schildkröte und anderer Reptilienspezies erwähnt (SNIPES, 1984). SNIPES et al. (1980) können *Pasteurella* spp. bei wildlebenden und bei in Gefangenschaft lebenden Wüstenschildkröten nachweisen. Obwohl Indol-positive hämolytische Pasteurellen (IPHP) auch in Nase und Maulhöhle gesunder, in Gefangenschaft gehaltener Wüstenschildkröten gefunden werden, ist ein Nachweis dieser Keime bei Schildkröten mit einer Infektion des Atmungstraktes besonders häufig (SNIPES et al., 1980). SNIPES und BIBERSTEIN (1982) charakterisieren diesen Keim zwei Jahre später und schlagen *Pasteurella testudinis* als Nomen dieser neuen Spezies vor. Nach SNIPES (1984) führt der Kontakt gesunder Schildkröten mit klinisch kranken Tieren, die *Pasteurella testudinis* im Nasenausfluß ausscheiden, nicht zum Auftreten einer klinischen Erkrankung. JANG und BIBERSTEIN (1991) untersuchen das Vorkommen von *Pasteurella testudinis* in Verbindung mit klinischen Erkrankungen von Landschildkröten, welche in der Universitätsklinik von Davis, Kalifornien, vorgestellt werden und vermuten pathogene Fähigkeiten eines opportunistischen Keimes. Laut JACOBSON et al. (1991b) werden zwar vor allem Pasteurellen bei an URTD erkrankten freilebenden Wüstenschildkröten nachgewiesen, eine Übertragung von *Pasteurella testudinis* auf gesunde Wüstenschildkröten führt jedoch nicht zum Auftreten einer respiratorischen Erkrankung. Viele Autoren können bei der URTD der Landschildkröte Pasteurellen nachweisen (JACOBSON und GASKIN, 1990; JACOBSON, 1992; JACOBSON et al., 1995; MCLAUGHLIN, 1997; MCLAUGHLIN et al., 2000; DICKINSON et al., 2001). JACOBSON et al. (1995)

schreiben diesen Keimen zwar eine verstärkende Wirkung respiratorischer Symptome bei der Landschildkröte zu, als auslösendes Agens der URTD erachten die Autoren aber hauptsächlich *Mycoplasma agassizii*. BROWN et al. (1994) zeigen in einer Transmissionsstudie, daß die ausschließliche Übertragung von *Pasteurella testudinis* im Gegensatz zur intranasalen Inokulation dieses Keimes in Kombination mit Mykoplasmen nicht zur Entwicklung der URTD der Wüstenschildkröte führt. Auch hier schreiben die Autoren *Pasteurella testudinis* eher eine synergistische Rolle zu (BROWN et al., 1994). SNIPES et al. (1995) mißlingt in einer Untersuchung der Nachweis eines spezifisch pathogenen Stammes von *Pasteurella testudinis*.

Häufig unterbleibt bei den vorgenommenen bakteriologischen Untersuchungen eine weiterführende spezielle Untersuchung auf Mykoplasmen ebenso wie eine parallele virologische oder histopathologische Untersuchung. Somit kann es zum Übersehen der eigentlichen Ursache der Infektion kommen.

#### **2.3.1.4 Viren**

Laut AHNE (1992; 1993) lassen sich die Viren der Schildkröten in zwei große Gruppen einteilen. So existiert einmal die Gruppe der Arboviren (Toga-, Flavi-, Rhabdo- und Bunyaviren), welche von Arthropoden übertragen werden. Diese können schwere Erkrankungen bei wechselwarmen Vertebraten auslösen und treten in der Regel bei freilebenden Schildkröten als inapparente Infektionen auf (AHNE, 1992,1993). Des weiteren gibt es die originären Schildkrötenviren (Papilloma-, Polyoma-, Herpes- und Iridoviren), welche zu schweren Erkrankungen und zum Teil auch in größeren Schildkrötenbeständen zu

Enzootien mit hohen Mortalitätsraten führen (AHNE, 1992,1993; BLAHAK, 2000b). SCHUMACHER (2000) berichtet von der Diskrepanz zwischen der Häufigkeit gefundener Reptilienviren und dem fehlenden Nachweis einer Verbindung zu klinischen Erkrankungen. Laut JACOBSON (1993) wird die Diagnose einer Virusinfektion und Zuordnung zu einer Familie in den meisten Fällen durch elektronenmikroskopische Befunde wie Virus-Größe, -Morphologie und -Lokalisation gestellt. Zusätzlich sollte laut JACOBSON (1993) wann immer möglich der Versuch einer Virusisolation durchgeführt werden. SCHUMACHER (1996) erwähnt die Möglichkeit, histopathologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Organbiopsien wie zum Beispiel der Leber, oder elektronenmikroskopische Untersuchungen von Urin, Speichel oder vesikulärer Flüssigkeit zur weiteren Diagnosestellung vorzunehmen. Neben den Herpesviren werden weitere virale Erreger (u.a. Iridoviren, Reoviren und Virus X, siehe unten) mit Erkrankungen des Respirationstraktes und des oberen Digestionstraktes der Schildkröten in Verbindung gebracht, auch wenn die Gruppe der Herpesviren laut AHNE (1992; 1993) mit Abstand die größte bei den Schildkrötenviren darstellt.

Iridoviren wurden bisher bei Griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*) in der Schweiz (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; MARSCHANG, 1999b; MARSCHANG et al., 1999) und bei Gopherschildkröten (*Gopherus agassizii*) in Amerika (WESTHOUSE et al., 1996) nachgewiesen. MÜLLER et al. (1988) schildern eine Massenepidemie von frisch aus Jugoslawien importierten Griechischen Landschildkröten, wobei innerhalb eines Monats 200 Tiere mit akutem oder subakutem Krankheitsbild verstarben. Laut

MÜLLER et al. (1988) zeigen die Tiere im subakuten Stadium purulente Rhinitis und Konjunktivitis, Pneumonie, ausgeprägter Stomatitis ulzerosa und massive Anasarka. Die akute Verlaufsform äußert sich in einem Hängenlassen des Kopfes, Maulatmung und subkutanem Halsödem, wobei die Schildkröten meist nach 1-2 Tagen sterben. Histologisch zeigen sich fibrinös-purulente Beläge der Zunge, des Pharynx; striäre Hyperämie von Ösophagus- und Magenmukosa, derbe Konsistenz der Lunge und miliare Lebernekrosen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergibt hexagonale Viruspartikel von 135-150 nm Durchmesser, die ausschließlich im Zytoplasma der Hepatozyten zu finden sind. Eine virologische Kultivierung kann nicht durchgeführt werden (MÜLLER et al., 1988). Die elektronenmikroskopischen Befunde decken sich mit denen bei einer von HELDSTAB und BESTETTI (1982) beschriebenen *Testudo hermanni*, welche nach zweitägiger Anorexie starb. Auch hier werden ausschließlich intrazytoplasmatische Einschlußkörperchen nachgewiesen (HELDSTAB und BESTETTI, 1982). WESTHOUSE et al. (1996) beschreiben die Iridovirusinfektion einer freilebenden Gopherschildkröte in Florida mit Anzeichen von URTD. Pathohistologisch zeigt sich das Bild einer nekrotisierenden ulzerativen Pharyngitis und Ösophagitis, ulzerativer Tracheitis und nekrotisierender Pneumonie. Elektronenmikroskopisch werden hier in Trachea und Lunge intrazytoplasmatisch gelegene, ikosaedrische Viruspartikel mit einem Durchmesser von 150-200 nm nachgewiesen. CHEN et al. (1999) isolieren Iridoviren aus chinesischen Weichschildkröten (*Trionyx sinensis*) auf einer Farm in Shenzhen, Volksrepublik China. MARSCHANG et al. (1999) beschreiben den Nachweis von Iridoviren bei *Testudo hermanni* aus der

Schweiz. Auch bei diesen Tieren zeigen sich ulzerative Läsionen in Maulhöhle, Zunge, Pharynx und Ösophagus mit Auflagerungen gelblichen fibronekrotischen Materials. Dabei gelingt erstmals eine Isolation des Iridovirus aus Zunge, Trachea, Lunge, Leber, Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm, Kloake, Niere und Gonaden.

Reoviren können aus mehreren Organen einer Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) aus der Schweiz isoliert werden (MARSCHANG, 1999b). Das Tier starb spontan, bei der Sektion zeigt sich unter anderem eine Nekrose des Zungenepithels. Eine histopathologische Untersuchung ergibt aufgrund des autolytischen Zustandes des Tierkörpers keine eindeutigen Befunde. Elektronenmikroskopisch werden ikosaedrische Viruspartikel mit einem Durchmesser von 75 nm nachgewiesen. Eine Virusisolation erfolgt aus Zunge, Lunge, Leber, Ösophagus und Niere. Aufgrund von Morphologie und Größe ordnet MARSCHANG (1999b) dieses Virus der Familie Reoviridae zu und teilt es hierbei dem Genus Orthoreovirus zu.

Ein weiteres Virus, das sogenannte Virus X, wird ebenso wie Herpesviren als möglicher Auslöser des Rhinitis-Stomatitis-Komplexes in Erwägung gezogen. MARSCHANG (1999b) und MARSCHANG et al. (1998; 2002) beschreiben die Isolation des Virus bei der Pantherschildkröte (*Geochelone pardalis*), der Griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni*), der Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*), der russischen Steppenschildkröte (*Testudo (Agrionemys) horsfieldii*) und der ägyptischen Landschildkröte (*Testudo kleinmanni*). Hierbei erfolgt der Nachweis zytopathischer Veränderungen in

Konjunktival-, Rachen- und Kloakentupfer am lebenden Tier und aus diversen Organen (u.a. aus Zunge, Trachea, Lunge, Ösophagus, Magen, Dünndarm, Milz, Leber, Herz und Gonaden) gestorbener Schildkröten (MARSCHANG, 1999b). Pathologisch-anatomisch diagnostiziert MARSCHANG (1999b) diphtheroid-nekrotisierende Glossitis, Stomatitis, Pharyngitis, Laryngitis und Ösophagitis, Bronchopneumonie, Pericholangitis und Glomerulonephritis. Einige Tiere zeigen hierbei ausschließlich Anzeichen einer Rhinitis. Aufgrund der vorgenommenen Charakterisierungsversuche vermutet MARSCHANG (1999b) ein unbehülltes, einsträngiges RNS-Virus, welches Filter mit einer Porengröße von 100 nm mühelos passiert. Eine elektronenmikroskopische Darstellung des Agens gelingt nicht (MARSCHANG, 1999b). Nach MARSCHANG und RUEMENAPF (2002) sind sogenannte Virus X Isolate besonders häufig bei der Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) und der Breitrandschildkröte (*Testudo marginata*) zu finden.

Mittels Elektronenmikroskopie weisen DRURY et al. (1998) papillomavirus-ähnliche Partikel in der Lungenspülung einer russischen Steppenschildkröte, einer *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*, mit Stomatitis nach.

Paramyxoviren und deren Antikörper können unter anderem laut BLAHAK (1994), SCHUMACHER (1996; 2000) und VIX und JAROFKE (1997) bei Schlangen mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems, des Respirations- und Digestionstrakts nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung einer Landschildkrötenkolonie mit erhöhten Todesfällen in Südafrika weisen OETTLE et al. (1990) paramyxovirus-ähnliche Einschlußkörperchen im Ösophagus eines

Tieres nach. Eine Isolation von Paramyxoviren gelang bisher bei Schildkröten jedoch noch nicht. Bei einer Untersuchung von Maurischen und Griechischen Landschildkröten halten JACKSON und NEEDHAM (1983) aufgrund bestehender Antikörpertiter einen Zusammenhang zwischen Sendaivirus (Paramyxovirus) und Rhinitis für möglich. Eine spätere Studie von LAWRENCE und NEEDHAM (1985) jedoch kann keinen Anstieg von Antikörpern gegen Sendaivirus innerhalb von drei Monaten feststellen. WITTE (1992) bzw. WITTE und BLAHAK (1993) gelingt zwar der Nachweis von Antikörpern gegen Sendaivirus und Paramyxo-7-ähnlichem Virus aus Landschildkröten, ein direkter Zusammenhang mit dem klinischen Bild auftretender Rhinitis kann jedoch auch hier nicht hergestellt werden.

### **2.3.2 Nichtinfektiöse Ursachen**

#### **2.3.2.1 Mangelerkrankungen und Haltungsfehler**

MILLER und BREVER (1982) vertreten die Ansicht, daß den meisten respiratorischen Erkrankungen der Reptilien durch Haltungsfehler Vorschub geleistet wird. COOPER und SAINSBURY (1994) schreiben unter anderem suboptimalen Haltungstemperaturen eine Mitbeteiligung an Stomatitiden der Reptilien zu. Metabolische Knochenerkrankung kann eine mögliche Ursache einer oralen Erkrankung bei Reptilien darstellen. Vitamin-C-Mangel, der als prädisponierender Faktor der Stomatitis bei einigen Autoren (WALLACH, 1969) Erwähnung findet, gilt laut COOPER und SAINSBURY (1994) nicht als gesicherte Stomatitisursache. Auch ROSS (1984) fehlt der tatsächliche Beweis dieser These in der Literatur. Chronische Mangelernährung gibt MADER (1996)



als mögliche Basis einer Infektion des oberen Verdauungstraktes bei Reptilien an.

Fehlerernährung und Vitaminmangel werden von FOWLER (1980b; 1980a) als mögliche prädisponierende Faktoren respiratorischer Infektionen bei in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten angesehen. Squamöse Metaplasie der Schleimhäute des Respirations- und Digestionstraktes, Zilienverlust und Verlegung epithelialer Drüsen führen nach FOWLER (1980b) zum Austrocknen der Schleimhäute, die somit leichter angreifbar für pathogene Keime werden. Eine andere mögliche Folge ist laut FOWLER die Hypersekretion der weiterhin funktionierenden Schleimhautdrüsen, die zu Maulhöhlen- und Nasenausfluß führen kann (FOWLER, 1980b). Diese an in Gefangenschaft gehaltenen Tieren erstellten Befunde lassen sich von JACOBSON et al. (1991b) bei wildlebenden Schildkröten nicht nachvollziehen. Serum- und Leberwerte von Vitamin A unterscheiden sich laut JACOBSON et al. (1991b) bei gesunden und an URTD erkrankten wildlebenden Schildkröten in keiner Weise voneinander.

#### **2.3.2.2 Traumata**

Rostrale Abrasionen und Bißwunden durch andere Reptilien im Bereich der Maulhöhle können laut COOPER und SAINSBURY (1994) vor allem bei Schlangen und Echsen häufiger beobachtet werden. Bei Schildkröten spielt vor allem die Verletzung durch Prädatoren wie Hunde, Katzen und andere Carnivoren oder durch Nager eine bedeutende Rolle (COOPER und SAINSBURY, 1994). Auch Rabenkrähen können eine ernsthafte Bedrohung für junge Schildkröten darstellen (KALETA, 2003). Hierbei können neben den

häufig betroffenen Extremitäten und anderen Körperteilen sowohl die Maulhöhle als auch der obere Respirationstrakt in Mitleidenschaft gezogen werden. FRANK (1985b) weist auf mögliche Verletzungen durch innerartliche Aggression paarungswilliger Landschildkrötenmännchen hin. Auch Verletzungen durch Mäuse und Ratten während des Winterschlafes der Reptilien, insbesondere bei Schildkröten, werden von FRANK (1985b) erwähnt.

Traumata des Panzers beobachten JACOBSON (1997) und ORIGGI und JACOBSON (2000) häufig bei wildlebenden Schildkröten. Verletzungen des Carapax (Rückenpanzers) sind häufig mit einer Beteiligung der Lunge verbunden. Bei Wasserschildkröten stammen die Verletzungen von Booten, bei Landschildkröten können sie durch Fahrzeuge aller Art oder durch das gemeinsame Nutzen der Grasflächen mit Rindern ausgelöst werden. Autounfälle und Attacken durch Hunde oder andere Prädatoren verursachen schwere Verletzungen (JACOBSON, 1997; ORIGGI und JACOBSON, 2000). Diese von den Autoren v. a. bei Gopherschildkröten gemachten Beobachtungen treffen auch auf wildlebende Schildkröten in Frankreich und Marokko zu.

### **2.3.2.3 Neoplasien**

Karzinome und Sarkome werden von JACOBSON (1981) bei Reptilien beschrieben. COOPER und SAINSBURY (1994) erwähnen gelegentliche Affektionen der Maulhöhle durch diese Tumoren. Laut MADER (1996) existieren eine ganze Reihe von Metaplasien im Bereich des oberen Verdauungstraktes.

JUNGE und MILLER (1992) beschreiben das Auftreten von Neoplasien im Respirationssystem der Reptilien eher selten. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von JACOBSON (1997) und ORIGGI und JACOBSON (2000), welche die Häufigkeit primärer Tumoren der Lunge als gering einstufen. Fibroadenome der Lunge sind bei Europäischen Sumpfschildkröten (*Emys orbicularis*) und bei Russischen Steppenschildkröten (*Testudo (Agrionemys) horsfieldii*) nachgewiesen worden (JACOBSON, 1997; ORIGGI und JACOBSON, 2000). Weiterhin berichtet JACOBSON (1997) vom Auftreten pulmonärer Fibrome der Lunge bei Suppenschildkröten mit Fibropapillomen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien

###### 3.1.1.1 Mykoplasmen-Anzucht und PCR

Alle hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit Gilson-Pipetman-Pipetten (Rainin Instrument Co., Woburn, Massachusetts, USA) und Aerosol-resistenten Einweg-Pipettenspitzen (Molecular Bio-Products, Inc., San Diego, California, USA) durchgeführt. Alle Chemikalien und Enzyme wurden von Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA) oder Fisher Scientific (Fair Lawn, New Jersey, USA) geliefert. Wenn andere Bezugsquellen benutzt wurden, wird dies im vorliegenden Text entsprechend gekennzeichnet.

###### 3.1.1.1.1 Für die Mykoplasmen-Anzucht verwendetes SP4-Medium (SP4-Mykoplasmenährmedium )

###### 1. Grundlage:

3,3 g Mykoplasmenährbouillongrundlage, ohne Kristallviolett

(Becton Dickinson, Maryland, USA)

10,0 g Bacto-Trypton (Difco Laboratories, Detroit, USA)

5,3 g Bacto-Pepton (Difco Laboratories, Detroit, USA)

4,0 ml Phenolrot, 0,5 % wäßrige Lösung

(Difco Laboratories, Detroit, USA)

630,0 ml Aqua bidest.

**2. Einstellen der Lösung auf pH 8,05.**

**3. Zugabe von 15 g Agar Noble (Difco Laboratories, Detroit, USA).**

**4. Aufkochen des gelösten Agars.**

**5. Autoklavieren der Lösung, Abkühlung auf 56°C vor dem Hinzufügen der Zusätze.**

**6. Zusätze:**

167,00 ml Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert

(Gibco BRL Products, Gaithersburg, USA)

50,00 ml CMRL 1066 (10X), w/o NaHCO<sub>3</sub>

(Gibco BRL Products, Gaithersburg, USA)

0,05 g L-Glutamin (SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

35,00 ml Hefeextraktdialysat (University of Florida, Gainesville)

100,00 ml Hefeextrakt („Yeastolate“), 2 %ige wäßrige Lösung

(Difco Laboratories, Detroit, USA)

10,00 ml Glukose, 50 %ige wäßrige Lösung

(Merck, Darmstadt)

## **7. Antibiotika**

200     $\mu$ l    Penicillin G (500.000 Units / ml)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

260     $\mu$ l    Cefoperazon (Cefobid<sup>®</sup>) (250 mg / ml)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

200     $\mu$ l    Polymyxin B (500.000 Units / ml)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

## **8. Vermischen der Zusätze und Antibiotika.**

**9. Filtration der Lösung durch Einmalfilter der Porengrößen 0,8, 0,45 und 0,2  $\mu$ m.**

**10. Hinzufügen zur abgekühlten Grundlage (bei einer Temperatur von ca. 56°C).**

**11. Einstellen des pH auf 7,6 – 7,8.**

### 3.1.1.1.2 Für die Mykoplasmen-PCR verwendete Pufferlösungen

#### **TBE-Puffer**

100 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (pH 8)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

100 mM Borsäure

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

1 mM Dinatrium-Ethylen-Diamintetra-Essigsäure (EDTA)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

Autoklavieren, Filtrieren, Aufbewahrung bei 4°C.

#### **Probenpufferlösung**

50 % steriles Glyzerin in Aqua bidest.

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

50 % 10 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (pH 7,4)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

1 mM Dinatrium-Ethylen-Diamintetra-Essigsäure (EDTA)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

0.25 % Bromphenolblau

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

0.25 % Xylenzylanol FF

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

Autoklavieren, Filtrieren, Aufbewahrung bei 4°C.

### **Verdauungspufferlösung**

100,0 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethan (pH 7,5)

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

0,05 % Tween 20-Detergenz

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

6,5 mM Dithiothreitol

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

Autoklavieren, Filtrieren, Aufbewahrung bei 4°C.



### 3.1.1.1.3 Für die Mykoplasmen-PCR eingesetzte Reagenzien und Isolate

#### Mastermix

**45    µl   Gesamtvolumen;** pro Probe verwendete Substanzen:

31,5    µl   steriles, nukleasefreies Aqua bidest.

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

4,0    µl   25mM Magnesiumchlorid

(Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

5,0    µl   10 fach konzentrierter **Reaktionspuffer**

(Endkonzentration 50 mM KCl, 10 mM Tris mit

einem pH von 9,0; 0,1 % Triton X-100)

(Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

2,0    µl   Mischung aus gleichen Anteilen von

10 mM **Desoxynukleotidtriphosphat** (dGTP, dATP, dTTP

und dCTP);

(Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

1,0    µl   **Primer Nr. 1**

(25 pmol / µl steriles, nukleasefreies Aqua bidest.;

Synthese des Primers an der Universität Florida\*)

1,0 µl **Primer Nr. 2**

(25 pmol / µl steriles, nukleasefreies Aqua bidest.;

Synthese des Primers an der Universität Florida\*\*)

0,5 µl Taq-Polymerase (2.5 Units) (Promega Corporation,

Madison, Wisconsin, USA)

**\*Primer Nummer 1 (16S-rRNS-Gen):** Gram positiv-spezifisch

(Sense-Strang Nt 7 bis 28, 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3', BROWN et al., 1995).

**\*\*Primer Nummer 2 (16S-rRNS-Gen):** Mykoplasmen-Genus-spezifisch

(Antisense-Strang Nt 1055 bis 1029,  
5'TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC -3', VAN KUPPEVELD et al.,  
1992).

**In der PCR eingesetztes Probenmaterial**

500 µl der gewonnenen Nasenspülprobe

**Positivkontrolle der Mykoplasmen-PCR**

1 µl gereinigte DNA von *Mycoplasma agassizii*-Stamm PS6, welcher aus der Nase einer *Gopherus agassizii* isoliert wurde, in einer Konzentration von 250 µg / µl und 4 µl steriles, nukleasefreies Aqua bidest. versetzt mit 45 µl des sogenannten „Mastermix“ (BROWN et al., 1992).

**Negativkontrolle der Mykoplasmen-PCR**

5 µl steriles, nukleasefreies Aqua bidest. versetzt mit 45 µl des sogenannten „Mastermix“.

**3.1.1.1.4 Für die Elektrophorese und Restriktionsenzymanalyse  
eingesetzte Reagenzien und Isolate****Marker für die Elektrophorese im Agargel**

Standardisierter Marker: Verdau von DNA des Bakteriophagen Phi X 174 mit dem Enzym „**Hae III**“ (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) mit gleichem Anteil an gefärbter Probenpufferlösung.

### **Positivkontrolle der Elektrophorese im Agargel**

*Mycoplasma agassizii* PS6-DNA, isoliert aus der Nase einer *Gopherus agassizii*

(BROWN et al., 1992).

### **Ansatz der Restriktionsenzymanalyse** (15,0 µl Gesamtvolumen je Probe)

8,0 µl des positiven PCR-Produktes

3,5 µl steriles, nukleasefreies Aqua bidest.

(SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, USA)

1,5 µl 10 fach konzentrierter

Restriktionsendonukleasereaktionspuffer (produziert und

geliefert vom Hersteller, spezifisch für „Age I“, New England

Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA; bzw. „Nci I“ oder

„Sau96I“, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

2,0 µl Restriktionsenzym (**Restriktionsendonukleasen**)

(„**Age I**“, New England Biolabs, Beverly, Massachusetts,

USA; bzw. „**Nci I**“ oder „**Sau96I**“, Promega Corporation,

Madison, Wisconsin, USA)

### **3.1.1.2 Mykoplasmen-ELISA**

Alle hier erwähnten Chemikalien sind bei SIGMA, Chemical Corporation, St. Louis, Missouri, USA erhältlich. Wenn andere Bezugsquellen benutzt wurden, wird dies im vorliegenden Text entsprechend gekennzeichnet.

#### **3.1.1.2.1 Für den Mykoplasmen-ELISA verwendete Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien**

##### **PBS / A**

Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit 0,02 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7,2

8,0 g NaCl (Merck, Darmstadt)

2,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

0,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

1,0 ml 20 %ige  $\text{NaN}_3$  (0,2 g  $\text{NaN}_3$  in 1 ml Aqua bidest.)

in 900 ml Aqua bidest.

pH-Einstellung auf 7,2 - 7,3 mit 1 N HCl bzw. 5 N NaOH.

Auffüllung ad 1000 ml mit Aqua bidest.

##### **PBS / T**

Mykoplasmen-ELISA-Waschpuffer mit 0,05 %igem Tween-20 Detergenz

8,0 g NaCl (Merck, Darmstadt)

2,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

0,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

1,0 ml 20 %ige  $\text{NaN}_3$  (0,2 g  $\text{NaN}_3$  in 1 ml Aqua bidest.)

0,5 ml Tween-20-Detergenz (Polyoxyethylen-Sorbit-Monolaurate)

in 900 ml Aqua bidest.

pH-Einstellung auf 7,2 - 7,4 mit 1 N HCl bzw. 5 N NaOH.

Auffüllung ad 1000 ml mit Aqua bidest.

### **PBS / TM**

PBS / T mit 5 % fettfreier Trockenmilch

### **Substratpuffer**

1,34 g  $\text{NaHCO}_3$  (Merck, Darmstadt)

1,49 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck, Darmstadt)

0,40 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt)

1,0 ml 20 %ige  $\text{NaN}_3$  (0,2 g  $\text{NaN}_3$  in 1 ml Aqua bidest.)

in 900 ml Aqua bidest.

pH-Einstellung auf 9,6 mit 1 N HCl, bzw. 5 N NaOH.

Auffüllung ad 1000 ml mit Aqua bidest.

### **Para-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP)**

Tablette pNPP (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA).

### **p-Nitrophenyl-Phosphat-Dinatrium-Lösung**

Gebrauchsfertige 20 mg Tablette pNPP (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in 20ml 0,01 M Natrium-Bikarbonatpuffer (pH 9,6; mit versetzt 2 mM MgCl<sub>2</sub>).

### **Antigen**

*Mycoplasma agassizii* PS6, isoliert aus der Nase einer *Gopherus agassizii*

(BROWN et al., 1992).

### **Antikörper**

Biotinylierter polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*-Antigen; IgY (Heavy chain) (SCHUMACHER et al., 1993).

### **Alkaline Phosphatase-Streptavidin**

Mit Alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin (AP-Streptavidin, Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, California, USA).

### **Negativkontrolle**

Blutplasma einer Gopherschildkröte, welche frei von URTD-typischen Läsionen war und deren Nasenspülprobe in der Mykoplasmen-Kultur negativ war; isoliert von I. M. Schumacher im Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Florida, Gainesville, USA (SCHUMACHER et al., 1993).

### **Positivkontrolle**

Blutplasma einer mit *Mycoplasma agassizii* infizierten Gopherschildkröte mit Läsionen des oberen Respirationstraktes; isoliert von I. M. Schumacher im Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Florida, Gainesville, USA (SCHUMACHER et al., 1993).

#### **3.1.1.3 Herpesvirusnachweis**

##### **3.1.1.3.1 Für den Herpesvirusnachweis verwendete Medien und Pufferlösungen**

Alle hier erwähnten Chemikalien sind bei Seromed, Biochrom KG, Berlin, Deutschland, erhältlich.

### **Minimum Essential Medium Eagle's (MEM)**

MEM-Fertigmedium mit Earle's Salzen (Seromed, Biochrom KG, Berlin), mit Zusatz von



- nichtessentiellen Aminosäuren

- NaHCO<sub>3</sub>

(pH 7,2)

### **Anzuchtmedium und Erhaltungsmedium der Zellkulturen**

88 %      MEM (Seromed, Biochrom KG, Berlin)

10 %      fetales Kälberserum (FKS, geprüft auf Mykoplasmen Seromed,  
Biochrom KG, Berlin, Deutschland)

1 %      Gentamicin (10mg/ml) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)

1 %      Amphotericin B (250 µg/ml) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)

**PBS (nach Dulbecco)**

8,0 g NaCl (Merck, Darmstadt)

0,4 g KCl (Merck, Darmstadt)

1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

1,0 g Glucose (Merck, Darmstadt)

20 ml Kanamycin (5mg/ml) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)

pH 7,2; gelöst in 1000 ml Aqua bidest. und steril filtriert.

**PBS-Versen**

8,0 g NaCl (Merck, Darmstadt)

0,2 g KCl (Merck, Darmstadt)

1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

0,2 g Titriplex III (EDTA) (Merck, Darmstadt)

20 ml Kanamycin (5 mg/ml) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)

pH 7,2; gelöst in 1000 ml Aqua bidest. und steril filtriert.

**Trypsinlösung (1 % in PBS)**

8,0 g NaCl (Merck, Darmstadt)

0,2 g KCl (Merck, Darmstadt)

1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , wasserfrei (Merck, Darmstadt)

1,0 g Glucose (Merck, Darmstadt)

10,0 g Trypsin (Merck, Darmstadt)

20 ml Kanamycin (5 mg/ml) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)

in 1000 ml Aqua bidest.

**Trypsin-PBS-Versenlösung**

5 ml Trypsinlösung (1 %ig)

95 ml PBS-Versen-Lösung

Dabei entsteht eine Lösung, die 0,05 % Trypsin enthält.

**Zum Herpesvirusnachweis eingesetzte Zellkultur**

*Terrapene carolina*- Herzzellen (TH1, Subline B<sub>1</sub>, ECACC, No. 90102528).

### **3.1.1.4 Charakterisierung der Virusisolate**

#### **3.1.1.4.1 Zur Charakterisierung der Virusisolate verwendete Reagenzien**

##### **Chloroform**

10 %iges Chloroform (Pro analysi, Art. 2445, Merck, Darmstadt).

##### **5-Jod-2-Desoxy-Uridin (IUDR)**

50 µg/ml 5-Jod-2-Desoxy-Uridin (IUDR, No. 1-7198, Sigma, St. Louis, USA).

##### **Herpesvirus-Neutralisationstest**

#### **3.1.1.4.2 Für Virustitration und Herpesvirus-Neutralisationstest verwendete Zellkulturen, Kontrollen und Virusisolate**

##### **Für Virustitration und Herpesvirus-Neutralisationstest eingesetzte Zellkultur**

*Terrapene carolina*- Herzzellen (TH1, Subline B<sub>1</sub>, ECACC, No. 90102528).

##### **Positivkontrolle (Herpesvirus-Neutralisationstest)**

Blutplasma einer *Testudo graeca* mit Herpesvirus-Antikörpern (aus den Routine-Einsendungen des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes Detmold).

**Negativkontrolle = Viruskontrolle (Herpesvirus-Neutralisationstest)**

Blutplasma einer *Testudo hermanni* ohne Antikörper gegen Schildkrötenherpesvirus (aus den Routine-Einsendungen des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes Detmold).

**Zellkontrolle (Herpesvirus-Neutralisationstest)**

MEM statt Virussuspension

**Virus 2245/92**

Herpesvirus, Isolation im Jahr 1992 im Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen durch Dr. Reinhard Biermann aus der Leber einer *Testudo hermanni*.

**Virus 770/95**

Herpesvirus, Isolation im Jahr 1995 im Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen durch Dr. Silvia Blahak aus der Zunge einer *Testudo hermanni*.

**Virus \*17/96**

Herpesvirus, Isolation im Jahr 1996 im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold durch Karina Angela Mathes aus Teilen der Zunge, des Ösophagus und der Trachea einer in Gonfaron gestorbenen *Testudo graeca graeca*.

### 3.1.2 Weitere Materialien und Geräte

#### Für die Blutprobenentnahme verwendete Gefäße

Mykoplasmen-Antikörpernachweis: Polysterol-Röhrchen, beschichtet mit Lithium-Heparin (Microtainer Brand Plasma Separator Tube with Lithium Heparin, Becton and Dickinson, Rutherford, New Jersey, USA)

Herpesvirus-Antikörpernachweis: Polysterol-Röhrchen, befüllt mit Spezialgel (Microtainer Brand Serum Separator Tube, Becton and Dickinson, Rutherford, New Jersey, USA)

#### Für die Mykoplasmen-PCR verwendete Gerätschaften

Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen Bio-Rad Laboratorien, Richmond, Californien, USA

Zentrifuge Eppendorf-Modell 5402-Zentrifuge mit 24-Platz-Rotor

Thermalblock PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts, USA)

**Gerätschaften für die Elektrophorese im Agargel**

UV-Transilluminator	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California, USA
Polaroidkamera	Fisher Scientific FB-PDC-34 mit Kameraaufsatz Fotodyn Katalognr. 5-5333, Tiffen Nr. 15 mit tiefgelbem Linsenfilter
Dokumentation	Polaroid-Film, Typ 667 (Asa 3000), Schwarz-Weiß-Film

**Für den Mykoplasmen-ELISA verwendete Gerätschaften**

96-Loch-Mikrotiterplatten	Maxisorb F96, (Nunc, Kamstrup, Dänemark)
ELISA-Washer	EL 403, (BioTechInstruments, Inc., Winooski, USA)
ELISA-Reader	EAR, 400 AT, (SLT-Laborinstrumente, 5082 Groedig / Salzburg, Österreich)

**Für die Aufarbeitung der Tupfer- und Organproben und für Charakterisierung der Virusisolate verwendete Gerätschaften**

Ultraschallgerät	Branson Sonifier 5200, 120 Watt (Branson Sonic Power, Danbury, CO, USA)
Zentrifuge	Varifuge 3.0 (Heraeus, Deutschland)

---

Filterkombination	Rezist 30/GF, gebrauchsfertige Filterhalter (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland)
FP030/3	Einmal-Filterhalter 0,2µm; 7 bar max., steril, pyrogenfrei (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland)
Inverses Mikroskop	TELAVAL 31 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

### 3.1.3 Untersuchte Proben und Einteilung der Schildkröten

Für die vorliegende Arbeit wurden in den Jahren 1996 und 1997 insgesamt 329 Schildkröten mittels Nasenspülprobe, Blut- und Tupferprobenentnahme auf Herpesviren und Mykoplasmen untersucht.

Dabei handelte es sich um Tiere unterschiedlicher Subspezies und verschiedener Herkunft. In Tabelle 5 sind die Tiere nach Untersuchungsjahr, Subspezies und Aufenthaltsort aufgelistet.

Die Einteilung der Schildkröten in unterschiedliche Subspezies (*Testudo hermanni hermanni*, *Testudo graeca graeca* oder *Testudo graeca iberica*) erfolgte nach standardisierten Kriterien. Hierbei zeichnet sich *Testudo hermanni hermanni* (THH), die Griechische Landschildkröte, unter anderem durch einen gelb-schwarzen Panzer mit zwei durchgehenden schwarzen Banden im lateralen Bereich des Plastrons (Bauchpanzers) aus (CHEYLAN, 1981). Der Schwanz endet bei dieser Art mit einem hornigen Fortsatz, dem sogenannten



End- oder Schwanznagel, das Supracaudalschild (Oberschwanzschild) ist in vielen Fällen zweigeteilt.

Der Grundfarbe des Panzers der Schildkröten aus dem *Testudo graeca*-Komplex ist sehr variabel. Die dunkle Zeichnung des Bauchpanzers ist in zwei unregelmäßigen Fleckenreihen angeordnet. Ein Schwanznagel fehlt dieser Art. Typischerweise sind bei *Testudo graeca* zwei zwischen Schwanz und Oberschenkel gelegene, deutlich hervortretende Hornkegel, sogenannte Sporne, ausgebildet. Häufig ist das Supracaudalschild (Oberschwanzschild) ungeteilt. Die Systematik der Maurischen Landschildkröte wird gerade revidiert (PIEH, in Bearbeitung). In der vorliegenden Schrift wurde daher bei der weiteren Unterteilung dieser Art in die Unterarten (Subspezies) *Testudo graeca graeca* (TGG) bzw. *Testudo graeca iberica* (TGI) den bis dahin üblichen Kriterien lokaler Fachleute in Gouafaren und Marokko gefolgt. In der Regel maximal eine Carapaxlänge von 20 cm erreichende TGG besitzen hiernach einen gelblichen Kopf, die Grundfarbe des Panzers ist meist von einem lichten ocker. TGI erreichen als Adulte eine Carapaxlänge von mehr als 20 cm, zeigen keinerlei Gelbfärbung des Kopfes, die Grundfarbe des Panzers und der Schuppen ist meist dunkel-olivgrün bis fast schwarz. Der tatsächliche Ursprungsort der im Schildkrötendorf in Gouafaren beprobten *Testudo graeca* ist in keinem der Fälle zweifelsfrei belegt. Nach PIEH und PERÄLÄ (2003 - im Druck) sind die in der Umgebung von Marrakesch gefundenen *Testudo graeca* demnächst vermutlich als *Testudo graeca soussensis sensu lato* einzuordnen.

Tabelle 5: Untersuchte Landschildkröten, Einteilung nach entsprechender Untersuchungsperiode

Untersuchungsperiode 1996			Untersuchungsperiode 1997		
Subspp.	Lebensraum	Anz. und G.	Subspp.	Lebensraum	Anz. und G.
THH	Schildkrötendorf	30 M	THH	Schildkrötendorf	
		30 W			1 W
		30 J		Ile du Levant	4 W
	G.A.			G.A.	2 M
					2 W
	freilebend			freilebend	40 M
					53 W
TGG	Schildkrötendorf	18 M	TGG	Schildkrötendorf	3 M
		21 W			1 W
	G.A.	11 M		G.A.	2 M
		10 W			
	freilebend			freilebend	15 M
					25 W
TGI	Schildkrötendorf	10 M	TGI	Schildkrötendorf	
		13 W			1 W
	G.A.	5 M		G.A.	
		2 W			

Abkürzungen: Anz. = Anzahl; G. = Geschlecht; G.A. = gerade angekommen; J = juvenil (Carapaxlänge von nicht mehr als 10 cm ); M = männlich; Subspp. = Subspezies; W = weiblich

**1996** wurden 180 Tiere untersucht welche seit längerem in Gefangenschaft lebten. Hierbei handelte es sich entweder um Schildkröten, welche sich schon länger im Schildkrötendorf in Gonfaron befanden oder gerade von Privatpersonen aus ihren Haushalten in ganz Frankreich ins Dorf gebracht oder geschickt worden waren und somit noch keinerlei Kontakt zu den in der Aufzucht- und Auffangstätte lebenden Schildkröten gehabt hatten. Diese sogenannten „Neuankömmlinge“ wurden in den Tabellen mit „G.A.“ (= gerade

angekommen) abgekürzt, angegeben. Bei den 1996 untersuchten Tieren handelte es sich im Einzelnen um: 90 *Testudo hermanni hermanni*, die schon seit längerem in den Gehegen des Schildkrötendorfes in Gonfaron lebten. Davon waren 30 Tiere männlich, 30 Tiere weiblich und 30 Tiere im juvenilen Alter (nicht größer als 10 cm Carapaxlänge). Weiterhin wurden 60 *Testudo graeca graeca* untersucht. Dabei entstammten 39 Tiere dem Dorf, wobei es sich um 18 männliche und 21 weibliche Tiere handelte. Die restlichen 21 Tiere waren Neuankömmlinge, wobei davon 11 Tiere männlichen und 10 Tiere weiblichen Geschlechts waren. Von den in diesem Jahr untersuchten 30 *Testudo graeca iberica* stammten 23 Tiere aus dem Dorf, wobei 10 männlichen und 13 weiblichen Geschlechts waren. Die verbleibenden 7 Tiere (5 Männchen und zwei Weibchen) waren Neuankömmlinge.

**1997** wurden 149 Tiere untersucht, wobei es sich nur bei 16 dieser Tiere um in Gefangenschaft gehaltene Schildkröten handelte. Der Großteil der in diesem Jahr untersuchten Landschildkröten stammte aus drei unterschiedlichen Regionen des Maurenmassivs in Frankreich oder aus der näheren Umgebung von Marrakesch in Marokko. Hierbei verteilten sich die 149 untersuchten Tiere wie folgt: 93 *Testudo hermanni hermanni*, die aus dem Maurenmassiv in der Umgebung von Gonfaron stammten. Es handelte sich bei den untersuchten Tieren um drei verschiedene Gruppen. Zum Schutze der letzten freilebenden *Testudo hermanni hermanni* in Frankreich werden im Folgenden keine genaueren Angaben zu den Fundorten im Maurenmassiv gemacht. Gezielt wurden jedoch freilebende Tiere jener Regionen ausgewählt, in welchen bisher nichts über einen Aufenthalt von in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten

bekannt war. All diese Proben wurden also in entlegenen Gebieten genommen, in denen wissentlich keine Auswilderung von Nachzucht- bzw. Fundtieren stattgefunden hatte. Diese Gruppe bestand aus 40 männlichen und 53 weiblichen Tieren. 40 *Testudo graeca graeca* stammten aus einer Region nördlich von Marrakesch. Bei diesen Tieren waren 15 männlichen und 25 weiblichen Geschlechts. Auch hier kann aufgrund der Fundstellen und den für die Schildkröten dort herrschenden Lebensbedingungen mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß es sich hierbei um Tiere handelte, die keinen Kontakt zu in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten gehabt hatten. Weiterhin wurden 16 Tiere untersucht, die in menschlicher Gefangenschaft gelebt hatten. Dabei handelte es sich um 4 weibliche *Testudo hermanni hermanni*, welche nach Aufenthalt im Village des tortues auf der Insel Levant in Südfrankreich ausgesetzt worden waren. Weitere 6 untersuchte Tiere (3 männliche und eine weibliche *Testudo graeca graeca*, eine weibliche *Testudo hermanni* und eine weibliche *Testudo graeca iberica*) lebten bereits über einen längeren Zeitraum im Schildkrötendorf in Gonfaron. Zusätzlich wurden 6 Neuankömmlinge des Schildkrötendorfes untersucht: zwei männliche und zwei weibliche in der Region gefundene und in einem Garten gehaltene *Testudo hermanni hermanni* und zwei männliche *Testudo graeca graeca*, welche aus Gefangenschaftshaltung stammten.

### **3.1.3.1 Vorgenommene Gruppierungen der untersuchten Schildkröten**

Zur sinnvollen statistischen Auswertung wurden die 1996 und 1997 untersuchten Schildkröten als eine Gruppe zusammengefaßt und dann je nach

Spezies und Subspezies, Lokalisation, Alter und Geschlecht in entsprechende Untergruppen unterteilt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Untersuchte Landschildkröten insgesamt

<b>1996 und 1997 untersuchte Schildkröten</b>				
Subspp.	Lebensraum	Anz. und G.	Anzahl	Prozent
THH	Schildkrötendorf	30 M	95	28,9 %
		35 W		
		30 J		
	G.A.	2 M	4	1,2 %
		2 W		
	freilebend	40 M	93	28,3 %
		53 W		
TGG	Schildkrötendorf	21 M	43	13,1 %
		22 W		
	G.A.	13 M	23	7,0 %
		10 W		
	freilebend	15 M	40	12,1 %
		25 W		
TGI	Schildkrötendorf	10 M	24	7,3 %
		14 W		
	G.A.	5 M	7	2,1 %
		2 W		
<b>gesamt</b>			<b>329</b>	<b>100,0 %</b>

Abkürzungen: Anz. = Anzahl; G. = Geschlecht; G.A. = gerade angekommen; J = juvenil (Carapaxlänge von nicht mehr als 10 cm ); M = männlich; Subspp. = Subspezies; W = weiblich

Von den 329 insgesamt untersuchten Schildkröten waren 299 (90,9 %) adulte Schildkröten und 30 Juvenile (9,1 %). Die 299 adulten Schildkröten ließen sich in 136 (41,3 %) männliche und 163 (49,6 %) weibliche Tiere untergliedern. Bei den untersuchten 30 Jungtiere konnte das Geschlecht aufgrund der fehlenden

Ausprägung sekundärer Geschlechtsmerkmale zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht bestimmt werden.

Die untersuchten Schildkröten konnten weiterhin aufgrund ihrer Subspezieszugehörigkeit unterteilt werden. Hierbei wurde, wie bereits erwähnt, den Kriterien lokaler Fachleute in Gonfaron und Marokko gefolgt. So gelangten 192 (58,4 %) THH, 106 (32,2 %) TGG und 31 (9,4 %) TGI zur Untersuchung.

Auch wurde eine grundsätzliche Unterteilung der untersuchten Tiere aufgrund ihres Lebensraumes vorgenommen. So wurden 133 (40,4 %) freilebende und 196 (59,6 %) in Gefangenschaft gehaltene Tiere getestet. Innerhalb dieser beiden Gruppen wurden wiederum die einzelnen Subspezies unterschieden. Hierbei wurden 93 (28,3 %) freilebende THH und 40 (12,1 %) freilebende TGG den 196 in Gefangenschaft lebenden Tieren gegenübergestellt. Diese in Gefangenschaft lebenden Schildkröten ließen sich weiterhin in 99 (30,1 %) THH, 66 (20,1 %) TGG und 31 (9,4 %) TGI aufgliedern. Die in Gefangenschaft gehaltenen Tiere wurden nochmals in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. So wurde zwischen den Tieren unterschieden, welche sich schon seit längerer Zeit im Schildkrötendorf aufhielten (95 bzw. 28,9 % THH; 43 bzw. 13,1 % TGG und 24 bzw. 7,3 % TGI) und den Tieren, welche gerade erst aus Privathaltungen im Dorf angekommen („G.A.“ = gerade angekommen) waren (4, bzw. 1,2 % THH; 23 bzw. 7,0 % TGG und 7 bzw. 2,1 % TGI). Ob es sich bei den Neuankömmlingen um Nachzuchten oder der Natur entnommene Tiere handelte, ließ sich dabei nicht zweifelsfrei belegen.

### **3.1.3.2 Klinische Untersuchung der Schildkröten**

Die bei jeder Schildkröte einmalig vor der Probenentnahme durchgeführte klinische Untersuchung erfolgte nach Erfassung des Körpergewichtes und einer Längen- /Breiten- und Höhenmessung des Panzers der Tiere. Hierbei wurde neben der Beurteilung des Ernährungszustands (u.a. Lage der Augäpfel und Fältelung der Haut) eine sorgfältige Überprüfung des Gesundheitszustands inklusive einer Kontrolle der Schildkröten auf möglicherweise bestehende Verletzungen oder andere pathologische Veränderungen vorgenommen. Eventuell auftretende geschwollene Augenlider, Konjunktivitis, Augenausfluß, Nasenausfluß und Atemgeräusche wurden gesondert beurteilt und eine Adspektion der Maulhöhle vorgenommen.

Eine sich aus Platzgründen im Anhang befindende Übersichtstabelle gibt unter anderem eine detaillierte Auskunft über die untersuchten Landschildkröten inklusive Untersuchungsnummer, Subspezies, Identifikationsnummer, Geschlecht und Lokalisation der Tiere sowie über die Ergebnisse der Laboruntersuchungen.

### **3.1.3.3 Entnahme der Nasenspülproben**

Zur Durchführung der Nasenspülung wurden eine 1 bzw. 2 ml-Spritze und 0,8 bis 2,0 Milliliter sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet. Die Spritze wurde, nach vorheriger Reinigung der Nasenregion mit 70 %igem Alkohol mittels Tupfer, nacheinander direkt auf beide Nasenlöcher aufgesetzt (Abbildung 1). Die Spülflüssigkeit wurde vorsichtig in die Nasenhöhle gegeben

und dann wieder abgezogen. Durch mehrmaliges Betätigen des Spritzenkolbens wurde so eine mit der Mikroflora der Nasengänge und Nasenhöhle angereicherte Flüssigkeit gewonnen. Diese wurde anschließend in Eppendorfgefäße verbracht und bei -80°C eingefroren.



Abbildung 1: Durchführung der Nasenspülprobe bei einer *Testudo graeca iberica*

#### **3.1.3.4 Blutprobenentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte nach vorheriger Desinfektion mit 70 %igem Alkohol im dorsalen Schwanzbereich aus dem *Ramus coccygeus lateralis praecipus*, bzw. *Sinus intervertebralis dorsalis* (WILLETTE-FRAHM, 1995).

Zum Antikörpernachweis auf Mykoplasmen wurden ca. 0,45 - 0,75 ml Blut entnommen und in ein mit Lithium-Heparin beschichtetes Polysterol-Röhrchen verbracht. Dieses wurde nach ca. 30 minütigem Stehenlassen zentrifugiert und



das so erhaltene Plasma in Eppendorfgefäße verbracht und bei -80°C eingefroren.

Zum Nachweis der eventuell vorhandenen Herpesvirus-Antikörper wurden ca. 0,45 - 0,75 ml Blut in ein mit einem Spezialgel befülltes Polysterol-Röhrchen verbracht, dieses nach ca. 15 Minuten zentrifugiert und das so erhaltene Plasma ebenfalls in Eppendorfgefäße verbracht und bei -80°C eingefroren.

#### **3.1.3.5 Entnahme der Tupferproben**

Bei der Entnahme der Tupferproben zur Untersuchung auf Herpesviren wurden je nach Alter der Tiere in Form und Größe variierende sterile, versiegelte Stieltupfer verwendet, welche zuvor mit ca. 2 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung befüllt worden waren. Daraufhin erfolgte die erste Tupferprobenentnahme in der Maulhöhle, vor allem im Bereich unter und auf der Zunge (Abbildung 2). Die zweite Tupferprobe wurde aus der Kloake entnommen. Die Proben wurden ebenfalls bei -80°C eingefroren.



Abbildung 2: Durchführung einer Tupferprobe der Maulhöhle bei einer *Testudo graeca iberica*

Aufgrund der örtlichen Gegebenheiten konnte weder eine bakteriologische noch eine parasitologische Untersuchung der in Frankreich oder Marokko getesteten Tiere durchgeführt werden.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Methoden zur Untersuchung auf Mykoplasmen**

#### **KULTURELLE UNTERSUCHUNGEN**

##### **3.2.1.1 Kultureller Mykoplasmennachweis**

Von jeder in der Mykoplasmen-PCR eingesetzten Nasenspülprobe (ca. 0,8 bis 2,0 ml sterile physiologische Kochsalzlösung mit entsprechender Bakterienflora

der Nasenhöhle und evtl. gewonnenem oberflächlichem Epithel der Nasenhöhle) wurde eine Anzüchtung auf einem speziellen SP4-Mykoplasmenährmedium (TULLY et al., 1979) vorgenommen.

Den zu untersuchenden Proben wurde je 1 ml SP4-Mykoplasmenährbouillon zugegeben, welche zuvor mit Glukose und Phenolrot versetzt worden war. Die Proben wurden daraufhin 24-48 Stunden bei einer Umgebungstemperatur von 30°C inkubiert. Bei Umschlag des Indikators Phenolrot in eine gelbliche Farbe (aufgrund der Fermentation der Glukose durch Mykoplasmen, durch Pilze oder durch Mykoplasmen und Pilze) wurden 20 µl der Lösung auf ein SP4-Mykoplasmenährmedium verbracht und bei 30°C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt der umgebenden Luft bebrütet. Wurden auf dem SP4-Mykoplasmenährmedium nach einigen Tagen typische Mykoplasmen-Kolonien sichtbar, wurden diese Kolonien erneut als sogenannte „Reinisolate“ zur Anreicherung in eine SP4-Mykoplasmenährbouillon transferiert, diese wiederum für mehrere Tage bei 30°C inkubiert und dann zunächst bei - 80°C eingefroren. Der Rest der Original-Proben wurde ebenfalls bei - 80°C eingefroren.

Häufig trat bei der Anzucht der Mykoplasmen in der SP4-Mykoplasmenährbouillon ein Farbumschlag der Nährlösung aufgrund einer Kontamination mit Pilzen auf. In diesem Fall wurden die eventuell ebenfalls vorhandenen Mykoplasmen bei nachfolgenden Inokulation auf dem SP4-Mykoplasmenährmedium von Pilzen überwuchert. Zur Vermeidung dieses

Problems hatte sich ein kurzzeitiges Einfrieren der Nährbouillon bei - 70°C vor dem Verbringen auf das SP4-Mykoplasmenährmedium als hilfreich erwiesen.

Mit Hilfe der Mykoplasmen-PCR und anschließender Restriktionsanalyse wurde eine Analyse der so aus der SP4-Mykoplasmenährbouillon gewonnenen Mykoplasmen-Reinkulturen vorgenommen.

## **MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN**

### **3.2.1.2 Mykoplasmen-PCR**

Zur Analyse der Nasenspülproben zum direkten Nachweis einer Mykoplasmen-DNA wurde die von BROWN et al. (1995) beschriebene PCR verwendet, deren Zielsequenz im 16S-rRNA-Gen der Bakterien liegt.

#### **3.2.1.2.1 Aufarbeitung des Ausgangsmaterials (Template-Präparation)**

Die Nasenspülproben wurden auf Zimmertemperatur gebracht und je 500 µl der Probe in ein Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und bei 16.000 x g in einer Eppendorf-Zentrifuge für eine Stunde bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, wobei sorgfältig darauf zu achten war, daß das entstandene Pellet nicht zerstört wurde. Zu dem im Röhrchen verbleibenden Inhalt wurden 2-3 µl Proteinase K (20 mg / ml steriles nukleasefreies Aqua bidest.) und 20 µl Verdauungspuffer gegeben.

Die Suspension wurde durchmischt und für 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Proteinase K durch 15-20 minütige

Erhitzung bei einer Temperatur von 97°C. Nach erneuter Durchmischung der Substanzen und anschließender Zentrifugation (30 Sekunden) wurden 5 µl der Probe entnommen und zur weiteren Verarbeitung 45 µl einer Reaktionslösung, dem sogenannten Mastermix, zugefügt.

Nach gutem Durchmischen wurden 45 µl des „Mastermix“, und 5 µl der wie oben beschrieben aufgearbeiteten Probe, des sogenannten Template, in ein 0,5 ml Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert, dieses mit jeweils einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in den Thermalblock verbracht. Bei jedem Reaktionsansatz wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um 1 µl DNA (*Mycoplasma agassizii* PS6-DNA, isoliert aus der Nase einer *Gopherus agassizii*, in einer Konzentration von 250 µg / µl) und 4 µl steriles nukleasefreies Aqua bidest., bei der Negativkontrolle um 5 µl steriles nukleasefreies Aqua bidest., beide versetzt mit je 45 µl des „Mastermix“. Diese Lösungen wurden ebenso in Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert, diese mit jeweils einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in einen Thermalblock verbracht.

#### **PCR-Bedingungen im Thermalblock (Primer Nummer 1 und 2):**

Die hier aufgeführten PCR-Bedingungen wurden für eine Mykoplasmen genus-spezifische Amplifikation verwendet, wobei das zu erwartende PCR-Produkt eine Länge von ca. 1050 Basenpaaren aufweisen sollte.

**Denaturierung:** Die DNA (Template) lag als Doppelstrang vor und wurde bei 94°C in Einzelstränge zerlegt (Zeitdauer: 45 Sekunden).

**Primerhybridisierung (Annealing):** Anlagerung der Primer an die nun denaturierte DNA, die Temperatur war von der Basenzusammensetzung der Primer abhängig (errechnete sich aus dem Anteil der Basen Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin, lag ca. 5°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der Primer), (Zeitdauer: 60 Sekunden bei 59°C).

**Primerverlängerung (Extension):** mit Hilfe der Taq-Polymerase und Desoxynukleotid-Triphosphaten bei 72°C und somit Synthese des komplementären DNA-Stranges (Zeitdauer: 120 Sekunden).

Fünzigfache Wiederholung der oben erwähnten Temperaturzyklen (45 Sekunden bei 94°C, 60 Sekunden bei 59°C, 120 Sekunden bei 72°C).

**Endextension** bei 72°C für 10 Minuten, dann Kühlung der Proben bei 4°C.

### 3.2.1.3 Elektrophorese im Agargel

Zur Darstellung der Mykoplasmen-PCR-Produkte wurden diese mit Hilfe der Agargelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Zur Herstellung eines 6.5 x 10 x 0.6 cm großen Gelblocks wurden 0.6 g Agarose in einen 250 ml Erlenmeyerkolben eingefüllt. 40 ml TBE-Puffer und etwas steriles Aqua bidest. wurden der Agarose zugesetzt und die Lösung für 4 Minuten im Mikrowellenherd erhitzt, bis sich die Agarose gelöst hatte. Dann wurden 2-3 Tropfen Ethidiumbromid (stark mutagene Substanz) in einer Konzentration von 0.5 µg / ml zugegeben. Durch vorsichtiges Schwenken des

Kolbens erfolgte ein Durchmischen der Lösungen. Hierbei mußte sorgfältig auf Vermeidung der Luftblasenbildung geachtet werden. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf ca. 50°C wurde diese in die bereits vorbereitete hitzebeständige Gelkammer mit eingesetztem Kamm ausgegossen.

Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde der eingesetzte Kamm entfernt und das Geltablett in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Menge zugegebenen TBE- Laufpuffers wurde so bemessen, daß das Agarosegel ca. 1 mm hoch mit Puffer bedeckt war.

Vor Einfüllen der Probe in die Geltaschen wurde 50 µl derselben mit 5 µl gefärbter 10X Probenpufferlösung versetzt. Nach gutem Durchmischen wurden 20 µl dieser Lösung in die Geltaschen pipettiert. Gleichzeitig wurden neben den Proben ein standardisierter Marker mit 1.25 µl der oben beschriebenen Probenpufferlösung sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle, (mit je 5 µl des Auftragspuffers versetzt), mitgeführt. Bei dem standardisierten Marker handelte es sich um den Verdau von DNA des Bakteriophagen Phi X 174 mit dem Enzym „Hae III“. (1.25 µl einer Konzentration von 1 µg / µl).

An die Gelelektrophoresekammer wurde eine konstante Spannung von 75 Volt (bei einer Stromstärke von 300 mA) angelegt, bis die Bromphenolblau- und die Xylenzyanol FF- Farblösung deutlich voneinander getrennt sichtbar wurden. Die bei einem pH von 7,4 des Laufpuffers negativ geladenen DNA-Produkte wanderten dabei in größenabhängiger Geschwindigkeit in Richtung der Anode.

Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht mit Hilfe eines Transilluminators untersucht. Die Mykoplasmen-PCR-Produkte konnten hierbei mit Hilfe des mitgeführten Ethidiumbromids, welches mit den DNA-Doppelsträngen interkalierte, UV-Licht absorbierte und bei 590 nm fluoreszierte, sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer Polaroidkamera und einem Polaroid-Schwarz-Weiß-Film, bei einer Belichtung mit 1/8 Sekunde und einer Blende von 8.

### **3.2.1.4 Restriktionsenzymanalyse**

Um bestätigen zu können, ob die positiven Mykoplasmen-PCR-Proben *Mycoplasma agassizii* entsprachen, wurden diese einer weiterführenden Untersuchung, der Restriktionsenzymanalyse, unterzogen.

Bei der Restriktionsenzymanalyse wurde die amplifizierte DNA der positiven PCR-Proben mit Hilfe spezifischer Endonukleasen in definierte DNA-Bruchstücke fragmentiert. Die Spaltung fand bei bestimmten Basenabfolgen statt, wobei 4-8 Basen als Erkennungsstelle dienten. Mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse erfolgte eine Charakterisierung der PCR-Produkte.

8,0 µl des positiven PCR-Produktes, 3,5 µl steriles nukleasefreies Aqua bidest., 1,5 µl 10fach konzentrierter Restriktionsendonukleasereaktionspuffer und 2,0 µl Restriktionsenzym („Age I“, bzw. „Nci I“ oder „Sau96I“) je Probe wurde für zwei bzw. 24 Stunden inkubiert (bei einer Temperatur von 25°C für „Age I“, bzw. 37°C für „Nci I“ und „Sau96I“). Daraufhin wurden je Probe 2 µl gefärbte 10X Auftragspufferlösung zugegeben. Die Probe konnte nun mit Hilfe der



Elektrophorese im Agargel nach dem bereits beschriebenen Verfahren analysiert werden.

## **SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN**

### **3.2.1.5 Mykoplasmen-ELISA**

Zur Detektion von Mykoplasmenantikörpern im Plasma wird der von SCHUMACHER et al. (1993) beschriebene ELISA verwendet.

Für den Mykoplasmen-ELISA wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten eingesetzt. Jede Vertiefung wurde mit 50 µl Antigenlösung (in PBS/A gelöstes Antigen in einer Konzentration von 30 µg/ml) beschickt. Als Antigen fungierte hierbei Mycoplasma agassizii PS6, welches aus der Nasenspülung einer Gopherschildkröte in Gainesville isoliert worden war (BROWN et al., 1992).

Nach 12stündiger Inkubation bei einer Temperatur von 4°C wurden die Platten mit einem automatischen ELISA-Washer 4 mal mit PBS/T gespült, jede Vertiefung mit 250 µl PBS/TM beschickt, die Platten abgedeckt und für 12 Stunden bei 4°C inkubiert.

Nach 4 weiteren Spülungen wurde jede Vertiefung mit 50 µl des zu untersuchenden Plasmas beschickt, welches zuvor im Verhältnis 1:10 mit PBS/TM verdünnt worden war. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten wurden die Platten nach dem oben beschriebenen Verfahren gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Antikörperlösung in einer Konzentration von 5 µg/ml. Hierfür wurde ein biotinylierter polyklonaler

Kaninchen-Antikörper gegen *Testudo (Agrionemys) horsfieldii* Antigen; IgY (Heavy chain) (SCHUMACHER et al., 1993) verwendet.

Nach einer weiteren Inkubation der Platten bei Raumtemperatur für 60 Minuten erfolgte dann wiederum der bereits oben beschriebene Waschvorgang. Daraufhin wurden den Proben je 50 µl mit Alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin, 1:2000 mit PBS/A verdünnt, zugegeben, 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit PBS/T gewaschen. Dann erfolgte pro Plattenvertiefung die Zugabe von jeweils 50 µl p-Nitrophenolphosphat-Dinatrium-Substrat (pNPP), welches zuvor in einer Konzentration von 1 mg/ml in Natrium-Bikarbonatpuffer gelöst worden war, verwendet. Jede Mikrotiterplatte wurde neben den zu testenden Proben mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle beschickt.

Die Platten wurden daraufhin bei Raumtemperatur für eine Stunde im Dunklen inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Extinktion jeder einzelnen Probe wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen.

Der Auswertung wurde durch Bestimmung der sogenannten **ELISA-Ratio** vorgenommen. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis der Extinktion der Probe zur Extinktion der Negativkontrolle bei 405 nm. Als **positiv** für *Mycoplasma agassizii* spezifische Antikörper wurden jene Proben angesehen, bei denen die oben beschriebene ELISA-Ratio bei einem Wert von  $\geq 3$  lag. Als zweifelhaft beurteilt wurden die Proben mit einem Wert zwischen 2 und 3, als **negativ** die Proben mit einer ELISA-Ratio mit einem Wert von  $\leq 2$ . Die

Berechnung der Cut-Off-Werte wurden hierbei von den Entwicklern des Schildkrötenmykoplasmen-ELISA übernommen, d.h. diese Einteilung erfolgte analog der in Gainesville an der Universität von Florida seit 1997 üblichen Kriterien (MCLAUGHLIN, 1997).

<b>ELISA-Ratio</b>	<b>Beurteilung</b>
ELISA $\leq 2$	negativ
ELISA zwischen 2 - 3	zweifelhaft
ELISA $\geq 3$	positiv

### **3.2.2 Methoden der Untersuchung auf Herpesviren**

#### **KULTURELLE UNTERSUCHUNGEN**

##### **3.2.2.1 Kultureller Herpesvirusnachweis**

###### **3.2.2.1.1 Aufarbeitung des Ausgangsmaterials zum kulturellen Herpesvirusnachweis**

###### **Tupferproben**

Zum Nachweis von Herpesviren wurden insgesamt 658 Tupferproben untersucht, wobei es sich um 329 Maulhöhlentupfer und 329 Kloakentupfer derselben Tiere handelte.

Nach Auftauen der Proben wurden diese in mit 2 ml MEM befüllte sterile Schraubdeckelröhrchen verbracht und 5 Minuten mittels Ultraschallgerät aufgeschlossen, um so eventuell intrazellulär vorliegende Viruspartikel freizusetzen. Die Röhrchen wurden dann 5 Minuten bei 1000 x g in einer Varifuge zentrifugiert. Daraufhin wurde die Probe filtriert. Es folgte nochmals eine 10-minütige Zentrifugation der Röhrchen bei 1000 x g. Anschließend wurden die Proben jeweils im Doppelansatz auf TH1-Zellkulturen verimpft.

###### **3.2.2.1.2 Vorbereitung benötigter Zellkulturen und anschließende Inokulation aufgearbeiteter Proben**

Zellkulturen aus *Terrapene carolina*-Herzzellen (TH1) wurden mit MEM mit Earle's Salzen als Erhaltungsmedium bis zu 7 Tagen in Zellkulturflaschen im

Brutschrank bei 28°C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Begasung bebrütet. Die Konzentration der TH1-Zellen betrug circa 10<sup>5</sup> Zellen / cm<sup>2</sup> der Flaschenbodenfläche.

Der ausgewachsene Zellrasen wurde mit Hilfe von Trypsin-PBS-Versen-Lösung abgelöst, vereinzelt und neu ausgesät. Dazu wurde zunächst der Überstand abgegossen, dann der Zellrasen mit Trypsin-PBS-Versen-Lösung (0.05 %) bedeckt. Nach Ablösen der Zellen erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 1000 x g für 5 Minuten. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Bodensatz in das Anzuchtmedium aufgenommen (1 Flasche mit 650 ml = 200 ml Anzuchtmedium). Dabei wurden die Zellen durch kräftiges Pipettieren im Medium resuspendiert. Nach Mischen der entstandenen Zellsuspension wurden je 0,5 ml der Lösung in jede Vertiefung einer 24-Loch-Platte pipettiert. Der verbleibende Rest der TH1-Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen gefüllt und wiederum bei 28°C inkubiert.

Nach 1-stündiger Inkubation der 24-Loch-Platten im Brutschrank bei 5 %iger CO<sub>2</sub>-Begasung und 28°C erfolgte die Verimpfung von 0,3 ml des Überstandes der wie zuvor beschrieben bearbeiteten Tupferprobe in jeweils zwei Vertiefungen (Doppelansatz je Probe). Daraufhin wurden die Platten wieder in den Brutschrank verbracht und bei täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle bis zu 7 Tagen bebrütet. Bei Auftreten eines zytopathischen Effektes (cpE), jedoch spätestens nach 7 Tagen, erfolgte die erste Passage der Zellen auf neue TH1-Zellkulturen.

Hierfür wurden die 24-Loch-Platten bei -80°C für mindestens 24 Stunden eingefroren, wieder aufgetaut, der Überstand aus zwei Vertiefungen in

Reagenzröhrchen überführt und für 5 Minuten per Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 1000 x g.

Von dem so erhaltenen und aufgearbeiteten Überstand wurden erneut je 0,3 ml im Doppelansatz auf wie bereits oben beschrieben behandelte und 1-stündig vorbebrütete TH1-Zellsuspension auf 24-Loch-Platten verbracht und im Brutschrank bebrütet. Bei auftretendem cpE, bzw. nach maximal 7-tägiger Bebrütung erfolgte nach erneutem 24-stündigem Einfrieren der Platten bei -80°C eine zweite Passage und darauffolgend eine dritte Passage der Proben.

### **3.2.2.2 Charakterisierung der Virusisolate**

Zur Virusidentifikation und Differenzierung wurden die positiven Proben mit cpE einer Chloroform- und IUDR-Behandlung unterzogen.

#### **3.2.2.2.1 Chloroformbehandlung**

Viren verschiedener Virusfamilien, zu denen u.a. auch die Herpesviren zählen, besitzen eine Lipidhülle, die durch Chloroformbehandlung zerstört wird. Damit geht die Infektiosität des Virus verloren.

0,9 ml des virushaltigen Überstandes wurden mit 0,1 ml 10 %igem Chloroform versetzt und die Proben eine Stunde auf einem Schüttler mit Aufsatz bei 14.000 Rüttlern/min durchmischt. Danach erfolgte eine 24-stündige Kühlung des Materials bei 4°C. Anschließend wurde die Suspension 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Hierbei wurden die Proben in 2 Phasen aufgetrennt: Die untere

Phase bestand aus Chloroform und den darin gelösten Substanzen, der Überstand enthielt das behandelte Virusmaterial.

Der so gewonnene Überstand wurde dann im Verhältnis von 1:30 mit MEM verdünnt und 0,3 ml der Suspension wurden auf eine TH1-Zellkultur verimpft (Aufbereitung siehe oben). Gleichzeitig wurde die unbehandelte Ausgangssuspension entsprechend mit MEM verdünnt und ebenfalls auf eine TH1-Zellkultur verimpft. Beide Zellkulturen wurden bei 28°C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert und einer täglichen lichtmikroskopischen Kontrolle unterzogen. Bei Auftreten eines deutlichen cpE der unbehandelten Kontrolle, spätestens jedoch nach 8 Tagen, wurde der Versuch beendet. Zeigte sich nur bei der unbehandelten Kontrolle ein zytopathischer Effekt, während die mit Chloroform behandelte Suspension nicht zu Zellveränderungen führte, wurde das isolierte Virus als chloroformlabil beurteilt.

#### **3.2.2.2.2 Verhalten der Zellkultur in Anwesenheit von 5-Jod-2-Desoxy-Uridin**

Durch Blockade der DNA-Synthese mit halogeniertem Uridin, welches den Einbau von Thymidin in die DNA kompetitiv verhindert, kann eine Bestimmung der Nukleinsäure des zu untersuchenden Erregers durchgeführt werden. DNA-haltige Viren wie z.B. Herpesviren können sich im Gegensatz zu RNA-haltigen Viren in Gegenwart von 5-Jod-2-Desoxy-Uridin (IUDR) nicht weitervermehren. Es wurden je 4 Löcher einer 24-Loch-Platte mit 0,3 ml Zellkulturüberstand beimpft. Nach einstündiger Inkubation bei 28°C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Begasung wurden jeweils zwei Proben mit 1 ml Erhaltungsmedium überschichtet,

welchem zuvor 0,05 mg/ml 5-Jod-2-Desoxy-Uridin zugesetzt worden war. Zwei Proben wurden als Kontrolle mit 1 ml IUDR-freiem Erhaltungsmedium überschichtet. Anschließend erfolgte die 8-tägige Bebrütung der Proben. Bei Auftreten eines deutlichen cpE der unbehandelten Proben wurde der Versuch beendet. Die beiden beimpften Zellkulturen wurden nach Einfrieren bei - 80°C geerntet und austitriert, um so den Titerunterschied zwischen der mit IUDR behandelten und der unbehandelten Virussuspension zu ermitteln. Der Zusatz von IUDR führte bei DNA-Viren zur Inhibierung ihrer Vermehrung.

#### **3.2.2.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung**

Positive Proben wurden zusätzlich der elektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Virushaltiger Zellkulturüberstand wurde auf mit Formvarfolie beschichteten Kupfergrids adsorbiert und anschließend mit Phosphorwolframsäure (PWS) negativ kontrastiert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Elektronenmikroskop - 10 C (Zeiss, Jena, Deutschland) bei 60 KV im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg. Das abgebildete elektronenmikroskopische Foto wurde in einer Vergrößerung von 1:85.000 (Negativ 1:1) vorgenommen. 1mm auf dem Negativ entspricht somit einer tatsächlichen Größe der Abbildung von 8,5 mm. Da alle Positive im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg mit einem vierfachen Vergrößerungsfaktor entwickelt werden, wurde die Größe des Balkens mit dem Faktor 4 multipliziert und somit die tatsächlichen Größenverhältnisse errechnet (1mm auf dem Positiv entspricht 34 mm).



## SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 3.2.2.3 Herpesvirus-Neutralisationstest

Der für die vorliegende Arbeit verwendete Neutralisationstest basiert auf der lichtmikroskopischen Auswertung des zytopathischen Effektes eines Schildkrötenherpesvirusisolates. Die zu untersuchende Blutplasmaprobe wurde nach Hitzeinaktivierung bei 56°C für 30 Minuten in 2er Potenzen mit MEM verdünnt und auf frisch subkultivierte, suspendierte *Terrapene Heart-1* Zellen gegeben. Dazu wurde jedes Feld einer 96-Loch-Platte mit der gleichen Menge eines bekannten Virusisolates beschickt. Waren in den zu untersuchenden Blutplasmaproben Antikörper gegen Schildkrötenherpesviren vorhanden, kam es zur Bindung derselben an die Viren und dadurch zur Verhinderung des normalerweise in den empfänglichen Zellsystemen auftretenden Herpesvirus-typischen cpE.

#### 3.2.2.3.1 Für die Neutralisationsteste verwendete Virusisolate

Für diese Arbeit wurden 3 verschiedene Herpesvirusisolate verwendet. Virus 2245/92 wurde von Dr. R. Biermann 1992 aus der Leber einer *Testudo hermanni* und Virus 770/95 1995 von Dr. S. Blahak aus der Zunge einer weiteren *Testudo hermanni* isoliert. Das dritte Isolat (\*17/96) wurde von mir aus Teilen der Zunge, des Ösophagus und der Trachea einer in Gonfaron verstorbenen *Testudo graeca graeca* isoliert. Organaufbereitung und Virusvermehrung wurden nach bereits beschriebener Methodik durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Insgesamt gelangten 329 Blutplasmaproben

mit jeweils allen drei erwähnten Herpesvirusisolaten im Neutralisationstest zur Untersuchung.

#### **3.2.2.3.2 Durchführung der Virustitration**

Zunächst wurde mit Hilfe der Virustitration eine quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität der drei Isolate durchgeführt. Die Virussuspensionen wurden nacheinander in Zehnerpotenzen von  $10^0$  bis  $10^{-10}$  mit Kulturmedium (MEM, siehe vorne) verdünnt, mit einem Schüttler durchmischt und auf 96-Loch-Mikrotiterplatten verbracht. In jede Vertiefung wurden dazu zunächst 0,025 ml MEM vorgelegt und aus den Vorverdünnungen jeweils 0,025 ml Virussuspension zugegeben, wobei pro Verdünnungsstufe jeweils 4 Vertiefungen der Platte beschickt wurden. Nachfolgend wurden jeweils 0,05 ml Zellsuspension (*Terrapene carolina* heart cells, TH1) zugegeben und die Mikrotiterplatten bei 28°C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit einem Gehalt von 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraufhin erfolgte eine tägliche lichtmikroskopische Überprüfung der Platten. Die Auswertung der Virustitration von Virus 770/95, Virus 2245/92 und Virus \*17/96 erfolgte am 7. Tag nach Beimpfung der Platten.

Die Berechnung der KID<sub>50</sub> je ml, der mittleren kulturinfektiösen Dosis, erfolgte anhand der Methode nach Spaerman und Kärber (MAYR et al., 1974; HIERHOLZER und KILLINGTON, 1996).

### 3.2.2.3.3 Durchführung des Herpesvirus-Neutralisationstestes

Zur Durchführung des Herpesvirus-Neutralisationstestes wurden die zu untersuchenden Proben zunächst aufgetaut und nachfolgend für 30 Minuten in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 56°C hitzeinaktiviert. Als Gebrauchsverdünnung wurde 100 KID<sub>50</sub> des Virus in 25µl eingesetzt, welche zuvor anhand der Virustitration bestimmt worden war.

Wiederum wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten verwendet. Alle Seren wurden im Vierfachansatz getestet. Pro Vertiefung wurden 0,025 ml MEM vorgelegt, je 0,025 ml zu untersuchende Blutplasmaprobe in zwei der oberen Vertiefungen gegeben und durch Überpipettieren der Proben eine Verdünnung in 2er Potenzen bis zur 10. Reihe der Mikrotiterplatte vorgenommen. Als Kontrolle wurden je 0,025 ml Blutplasma in zwei weitere Vertiefungen der Platten gefüllt. Als Positivkontrolle diente das Blutplasma einer *Testudo graeca* mit Herpesvirus-Antikörpern (aus den Routine-Einsendungen des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes Detmold). Als Negativkontrolle fungierte das Blutplasma einer *Testudo hermanni* ohne Antikörper gegen Schildkrötenherpesvirus (aus den Routine-Einsendungen des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes Detmold).

Daraufhin erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe der Virussuspension in 4 Stufen (z. B. Gebrauchsverdünnung 1:100, Verdünnungsreihe 1:1000, 1:10.000 und 1:100.000). 0,025 ml der Gebrauchsverdünnung wurde mit Ausnahme der Zellkontrolle in jede Vertiefung verbracht. Gleichzeitig wurde eine Mikrotiterplatte mit 0,025 ml MEM pro Vertiefung und jeweiligem 4-fach-

Ansatz der hergestellten Verdünnungsreihe zur Kontrolle der eingesetzten Gebrauchsverdünnung, einer Positiv- und einer Viruskontrolle (s. oben) beschickt.

Nach anschließender einstündiger Inkubation der Platten bei 28°C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank wurden 0,05 ml TH1-Zellsuspension (Aufbereitung und Präparation wie oben) je Vertiefung zugegeben. Die letzte Reihe der Platten wurde als Zellkontrolle nur mit TH1-Zellsuspension beschickt. Darauffolgend wurden die Platten erneut in den Brutschrank verbracht und bei täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle für 7 Tage inkubiert.

Die mathematische Auswertung der Testergebnisse nach Ablesung der Platten erfolgte nach der vereinfachten Labormethode zur Berechnung des Antikörpertiters nach Reed und Muench (MAYR et al., 1977).

### **3.2.3 Statistische Auswertung der vorgenommenen Untersuchungen**

#### **3.2.3.1 Allgemeiner Überblick**

Alle Daten der vorgenommenen Untersuchungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 8.0 und Excel 97 für Windows 2000 bearbeitet und ausgewertet. Zur Dokumentation der Untersuchung der Tupferproben auf Herpesviren wurde aufgrund der geringen Anzahl der positiven Tiere lediglich Excel 97 für Windows 2000 verwendet.

Die prozentualen Angaben innerhalb der Tabellen und Abbildungen wurden auf eine Dezimalstelle hinter dem Komma gerundet.

Um die Variablen der statistischen Rechnungen auf ihren möglichen Zusammenhang zu untersuchen, wurden der Chi-Quadratwert nach Pearson oder das Nominalmaß Phi ermittelt. Mit diesen Werten kann man nach SCHULZE (2000) eine Aussage treffen, ob die jeweiligen Variablen in einem signifikanten Zusammenhang stehen oder nicht. Der p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) gibt die Überschreitungswahrscheinlichkeit an, d.h. er prüft, wie stark die Nullhypothese durch die erhobene Stichprobe unterstützt werden kann.  $H_0$  ist die sog. Nullhypothese, die besagt, daß die beiden untersuchten Variablen unabhängig voneinander sind. Bei einem p-Wert von  $\leq 0,01$  muß die Nullhypothese (=H<sub>0</sub>) aufgrund der Stichprobe verworfen werden, die Irrtumswahrscheinlichkeit ist hierbei als hoch signifikant zu bezeichnen. Ein p-Wert von  $< 0,0005$  ist als hoch signifikant einzustufen. Bei einem Wert von  $\geq 0,1$  wird die Nullhypothese gestützt und kann somit unter dem angenommenen Signifikanzniveau angenommen werden, die Irrtumswahrscheinlichkeit ist hierbei als nicht signifikant zu bezeichnen. Werte dazwischen liegen im Ermessensbereich, beziehungsweise im Ermessensspielraum. Bezüglich der Korrelationskoeffizienten besagt  $H_0$ , daß die Variablen keinen signifikanten Zusammenhang aufweisen. Wird die Nullhypothese abgelehnt, so besteht ein Zusammenhang zwischen den Variablen. Muß ein Koeffizient für nominalskalierte Merkmale (zum Beispiel bei dem Mykoplasmen-ELISA-Befund) bei den Variablen verwendet werden, so

wurde der Kontingenzkoeffizient C eingesetzt. Bei Unabhängigkeit der Merkmale nimmt er den Wert 0 an, sein Maximalwert beträgt

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}}$$

mit  $m = \min (\underline{r} = \text{Anzahl Zeilen und } \underline{c} = \text{Anzahl Spalten})$ .

Teile des Vergleichs prozentualer Häufigkeiten wurden zur Verdeutlichung nach CAVALLI-SFORZA (1964) berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswertung der klinischen Symptome erkrankter Schildkröten

Nur 36 (10,9 %) der insgesamt 329 untersuchten Schildkröten zeigten klinische Symptome einer Erkrankung des oberen Respirations- und/oder Digestionstrakts, die restlichen 293 Tiere (89,1%) waren frei von Symptomen. Der Großteil der 36 klinisch auffälligen Tiere zeigte nur minimale Anzeichen einer Erkrankung in Form eines geringgradigen Nasenausflusses. Bei stärker betroffenen Schildkröten konnte man zum Teil bläschenbildenden, klaren Nasenausfluß bis hin zu starkem seromukösen Ausfluß der Nase beobachten. Dieser wurde bei sehr zähem Nasensekret erst nach Druck auf den Gesichtsschädel sichtbar (Abbildung 3). Nur bei drei Tieren konnte eine Stomatitis diagnostiziert werden. Einige betroffene Tiere konnte man aufgrund der Dyspnoe, der daraufhin mit den Vorderbeinen unterstützten Atmung und dem lautstarken Stridor in einer Gruppe von Schildkröten erkennen. Auch fielen schwer erkrankte Schildkröten meist durch Kachexie und Exsikkose (eingefallene Augäpfel, stark gefältelte Haut an Extremitäten und Hals) auf. Eine Konjunktivitis, wie sie im Zusammenhang mit der Mykoplasmeninfektion der Gopher- und Wüstenschildkröten in Amerika auftritt, konnte in dieser Studie bei mediterranen Landschildkröten nicht beobachtet werden.



Abbildung 3: TGG mit muköser Rhinitis, deutlich nach Druck auf Gesichtsschädel

Wie aus Tabelle 7 und Tabelle 8 hervorgeht, konnte bei 33 Tieren ausschließlich Rhinitis, bei 3 Schildkröten Rhinitis und Stomatitis festgestellt werden. Nicht zu an Rhinitis erkrankten Tieren wurden jene gezählt, deren festes, eingetrocknetes Nasensekret erst bei Spülung der Nasenhöhle sichtbar wurde. Dieser Befund trat vor allem bei in Marrakesch getesteten *Testudo graeca graeca* häufiger auf.

Tabelle 7: Klinische Symptome bei den 1996 untersuchten Schildkröten

N°	Probe	Subspp.	ID	G	Gesundheitszustand
1	96-9	TGG	1632	W	Rhinitis, Stomatitis
2	96-15	TGG	1625	W	Rhinitis
3	96-18	TGG	unmarkiert	W	Rhinitis, Stomatitis
4	96-19	TGG	1565	M	Rhinitis
5	96-20	TGG	1280	W	Rhinitis
6	96-84	TGG	1373	W	Rhinitis
7	96-85	TGG	1452	W	Rhinitis



N°	Probe	Subssp.	ID	G	Gesundheitszustand
8	96-87	TGG	1521	W	Rhinitis
9	96-91	TGG	231	W	Rhinitis
10	96-93	TGG	1236	W	Rhinitis
11	96-95	TGG	1414	W	Rhinitis
12	96-97	TGG	1466	W	Rhinitis
13	96-98	TGG	1405	W	Rhinitis
14	96-100	TGG	1633	M	Rhinitis
15	96-102	TGG	228	M	Rhinitis
16	96-103	TGG	252	M	Rhinitis
17	96-105	TGG	739	M	Rhinitis
18	96-107	TGG	831	M	Rhinitis
19	96-117	TGI	278	W	Rhinitis
20	96-129	TGG	1564	M	Rhinitis
21	96-137	TGI	869	M	Rhinitis
22	96-146	TGG	1637	W	Rhinitis
23	96-160	THH	unmarkiert	J	Rhinitis
24	96-170	THH	unmarkiert	J	Rhinitis

Abkürzungen: G. = Geschlecht; Subssp. = Subspezies; unmarkiert = ohne Markierung

Tabelle 8: Klinische Symptome bei den 1997 untersuchten Schildkröten

N°	Probe	Subssp.	ID	G	Gesundheitszustand
25	97-1	TGI	1695	W	Rhinitis, Stomatitis
26	97-35	THH	CLIP A568	W	Rhinitis
27	97-93	TGG	28 MA	M	Rhinitis
28	97-103	TGG	38 MA	W	Rhinitis
29	97-138	TGG	1757	M	Rhinitis
30	97-139	TGG	1758	M	Rhinitis
31	97-140	TGG	1660	W	Rhinitis
32	97-141	TGG	1632	M	Rhinitis
33	97-142	TGG	1534	M	Rhinitis
34	97-143	TGG	1611	M	Rhinitis
35	97-144	THH	1 BORMES	W	Rhinitis

---

N°	Probe	Subssp.	ID	G	Gesundheitszustand
36	97-145	THH	2 BORMES	W	Rhinitis

Abkürzung: G. = Geschlecht; Subssp. = Subspezies

Die in den beiden Untersuchungsjahren nach einmaliger Untersuchung festgestellten Symptome konnten wie folgt zusammengefaßt werden: Dyspnoe mit durch rhythmische Bewegungen der Vorderbeine unterstützte Atmung, ggf. Nasenausfluß, Stridor, Inappetenz, Kachexie, Exsikkose, eitrig-nekrotisierende Pharyngitis und Stomatitis in unterschiedlichen Schweregraden.

Eine Auflistung der klinisch erkrankten Schildkröten nach Subspezies und Lokalisation ist Tabelle 9 zu entnehmen.

**Tabelle 9:** Ergebnis der klinischen Untersuchung von Schildkröten auf Rhinitis und Stomatitis

<b>1996 und 1997 untersuchte Schildkröten</b>							
Subspp.	Lebensraum	Anz. und G	Symptome			Anz.	Ges.anz. Proz.
			ohne	Rhin	Rhin./ Stom.		
THH	Schildkröten dorf	30 M	30	0	0	3	
		35 W	34	1	0		
		30 J	28	2	0		
	G.A.	2 M	2	0	0	2	5 13,9 %
		2 W	0	2	0		
	freilebend	40 M	40	0	0	0	0 0,0 %
		53 W	53	0	0		
TGG	Schildkröten dorf	21 M	13	8	0	19	
		22 W	10	11	1		
	G.A.	13 M	9	4	0	7	26 72,2 %
		10 W	6	3	1		
	freilebend	15 M	14	1	0	2	2 5,6 %
		25 W	24	1	0		
TGI	Schildkröten dorf	10 M	9	1	0	3	3 8,3 %
		14 W	11	2	1		
	G.A.	5 M	5	0	0	0	0 0,0 %
		2 W	5	0	0		
<b>Ges.</b>		<b>329</b>	<b>293</b>				<b>36 100,0 %</b>

Abkürzungen: Anz = Anzahl; G = Geschlecht; G.A. = gerade angekommen; Ges. = Gesamt; Ges.anz. = Gesamtzahl der Tiere mit Symptomen; J = juvenil (Carapaxlänge von nicht mehr als 10 cm ); M = männlich; Proz. = Prozent; Rhin = Rhinitis; Rhin./ Stom. = Rhinitis und Stomatitis; Subspp. = Subspezies; W = weiblich

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, sind wesentlich mehr in Gefangenschaft gehaltene als freilebende Schildkröten klinisch erkrankt. Anzeichen von Rhinitis und/oder Stomatitis zeigten lediglich zwei freilebende TGG in Marokko (5,6 % der erkrankten Tiere), unter den Griechischen Landschildkröten in Frankreich

waren keinerlei erkrankte Tiere gefunden worden. Bei den restlichen 34 (94,4 %) an Rhinitis und/oder Stomatitis erkrankten Tieren handelte es sich um in Gefangenschaft gehaltene Schildkröten. Die in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten ließen sich in 5 THH (13,9 %), 26 TGG (72,2 %) und 3 TGI (8,3 %) untergliedern. Hierbei zeigten sowohl schon länger im Dorf lebende als auch neu angekommene Griechische und Maurische Landschildkröten klinische Anzeichen einer Rhinitis und/oder Stomatitis.

Deutliche Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit zeigten sich bei in Gefangenschaft gehaltenen Landschildkröten: TGG waren mit 39,4 % häufiger als TGI (9,7 %) betroffen, welche wiederum häufiger erkrankt waren als in Gefangenschaft gehaltene THH (5,1 %).

## **4.2 Auswertung der Untersuchungen auf Mykoplasmen**

### **4.2.1 Untersuchung der Nasenspülproben auf Mykoplasmen mittels Kulturverfahren**

Von allen 329 kulturell auf Mykoplasmen untersuchten Proben aus der Nasenhöhle zeigten 13 eine verdächtige Reaktion im Sinne einer Gelbfärbung der Bouillon. Die in Tabelle 10 aufgelisteten 13 Proben führten zum Farbumschlag der angesetzten Lösung und wurden auf SP4-Spezialagarplatten aufgebracht. Alle hier angeführten Proben stammten aus der Untersuchungsreihe des Jahres 1996, das Ergebnis aller 1997 genommenen Proben war in dieser Untersuchung negativ.

Tabelle 10: Ergebnis der kulturell-bakteriologischen Untersuchung von Nasenspülproben auf Mykoplasmen

<b>1996 und 1997 untersuchte Schildkröten</b>				
Subsp.	Lebensraum	Anz. und G.	positive Proben	
			mit Farbumschlag	mit Myk. Isolierung
THH	Schildkrötendorf	30 M	1	0
		35 W	0	0
		30 J	0	0
	G.A.	2 M	0	0
		2 W	0	0
	freilebend	40 M	0	0
		53 W	0	0
TGG	Schildkrötendorf	21 M	0	0
		22 W	6	3
	G.A.	13 M	0	0
		10 W	1	1
	freilebend	15 M	0	0
		25 W	0	0
TGI	Schildkrötendorf	10 M	1	1
		14 W	4	3
	G.A.	5 M	0	0
		2 W	0	0
<b>gesamt</b>		<b>329</b>	<b>13</b>	<b>8</b>

Abkürzungen: Anz. = Anzahl; G = Geschlecht; G.A. = gerade angekommen; M = männlich; mit Myk. Isolierung = Proben mit dem Auftreten typischer Mykoplasmenkolonien; Subsp. = Subspezies; W = weiblich

Bei dem Auftreten von typischen Mykoplasmen-Kolonien wurden die entsprechenden Isolate als sogenannte „Rein-Isolate“ erneut in SP4-Nährbouillon verbracht und bei -80°C eingefroren. Dies war bei 8 Tieren der Fall, die alle zu den Maurischen Landschildkröten zählten. Probennummern

009, 085, 086 und 095 stammten von *Testudo graeca graeca*; Probennummer 118, 120, 121 und 137 stammten von *Testudo graeca ibera* (Tabelle 10).

Als „typische“ Mykoplasmenkolonien wurden jene Kolonien bezeichnet, welche ein spiegeleiartiges Aussehen aufgrund des biphasischen Wachstumes aufwiesen. Hierbei konnten im Zentrum der Kolonien eine opake, granulierte Zone mit kegelförmigem Wachstum in die Tiefe des Mediums und eine flachere, durchsichtige Zone an der Peripherie der Kolonie unterschieden werden (siehe Abbildung 4).

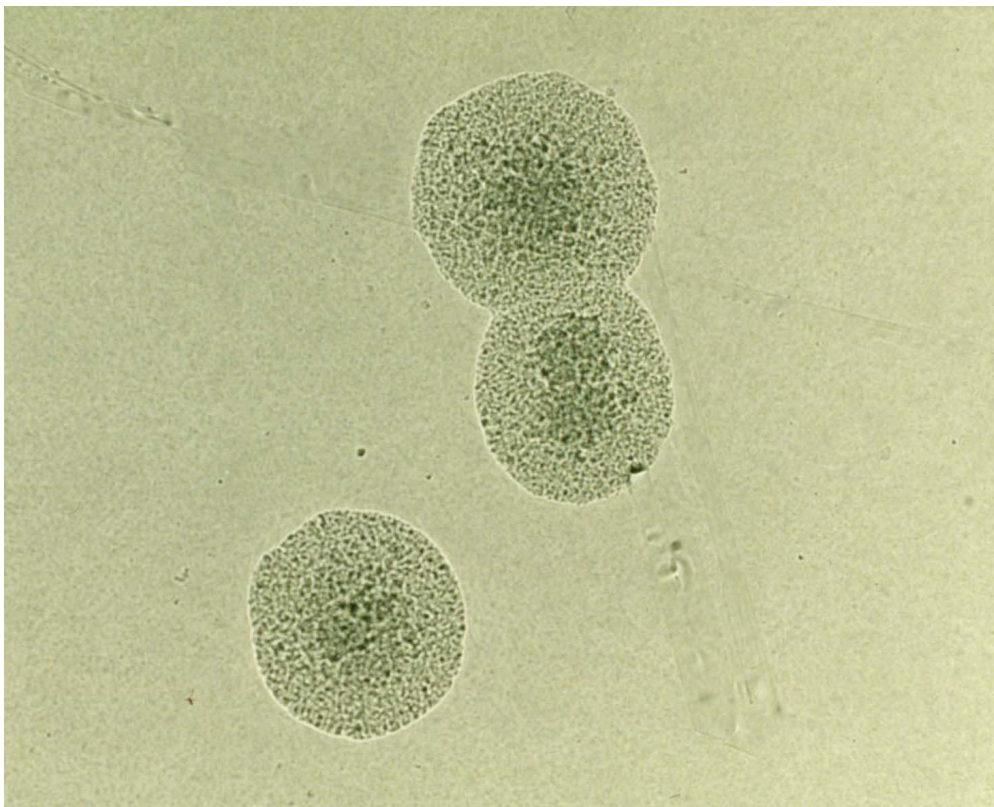


Abbildung 4: Nach 24-48stündiger Anzucht in SP4-Mykoplasmennährbouillon und anschließender 5-tägiger Bebrütung gewachsene Mykoplasmenkolonien auf SP4-Mykoplasmennährmedium (Isolat aus TGG 96-086 ).

---

Die PCR zur Detektion des 16S-rRNA-Gens wurde an allen 329 in der Bouillon bebrüteten Nasenspülproben vorgenommen. Mit Hilfe der verwendeten Primer sollten alle Mitglieder der Mollikuten-Gruppe nachgewiesen werden. Damit sollten zusätzlich sowohl die Mykoplasmen-Spezies, welche keine Glukosefermentation durchführen, als auch die durch Pilze überwachsenen Mykoplasmen-Proben, welche evtl. keine typischen Kolonien ausbilden konnten, ermittelt werden. Hierbei wurden keine weiteren positiven Proben als jene entdeckt, welche bereits Mykoplasmen-Rein-Isolate auf entsprechenden Agarplatten gezeigt hatten. Somit kann davon ausgegangen werden, daß alle PCR-positiven Proben Glukose-fermentierende Mykoplasmen-Spezies beinhalten. Das bei allen 8 positiven Proben erhaltene PCR-Produkt besaß eine Größe von ca. 1050 bp, was mit der vorhergesagten Größe von 1047 bp sehr gut übereinstimmte.

#### 4.2.2 Restriktionsenzymanalyse *Mycoplasma*-verdächtiger Isolate

Zur näheren taxonomischen Identifizierung der Mykoplasmen-Isolate wurde ein Teil des 16S-rRNA-Gens mit Hilfe einer PCR amplifiziert und anschließend einer Restriktionsanalyse unterworfen, wobei die Restriktionsendonukleasen „Age I“, „Nci I“ und „Sau96 I“ zum Einsatz kamen. Zum Vergleich wurde gereinigte DNA von *Mycoplasma agassizii* Stamm PS6 mituntersucht. Die durch Restriktion entstandenen Bandenmuster sind exemplarisch in Abbildung 5 und Abbildung 6 wiedergegeben. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Restriktionsenzymanalyse zusammenfassend dargestellt.

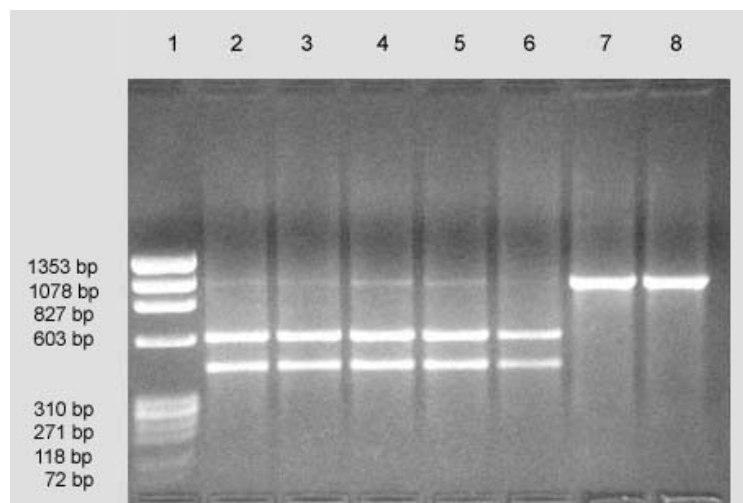


Abbildung 5: Restriktionsanalyse der PCR-Produkte aus den *Mycoplasma*-Isolaten von Schildkröten (16S-rRNA-PCR). Spur 1: Standardisierter Marker: Verdau von DNA des Bakteriophagen Phi X 174 mit dem Enzym „Hae III“. Spur 2: Isolat 96-009; Spur 3: Isolat 96-086; Spur 4: Isolat 96-118; Spur 5: Isolat 96-121 und Spur 6: Isolat 96-137 mit Restriktionsendonuklease Age I. Spur 7: Isolat 96-009; Spur 8: Isolat 96-086 mit Restriktionsendonuklease Nci I.



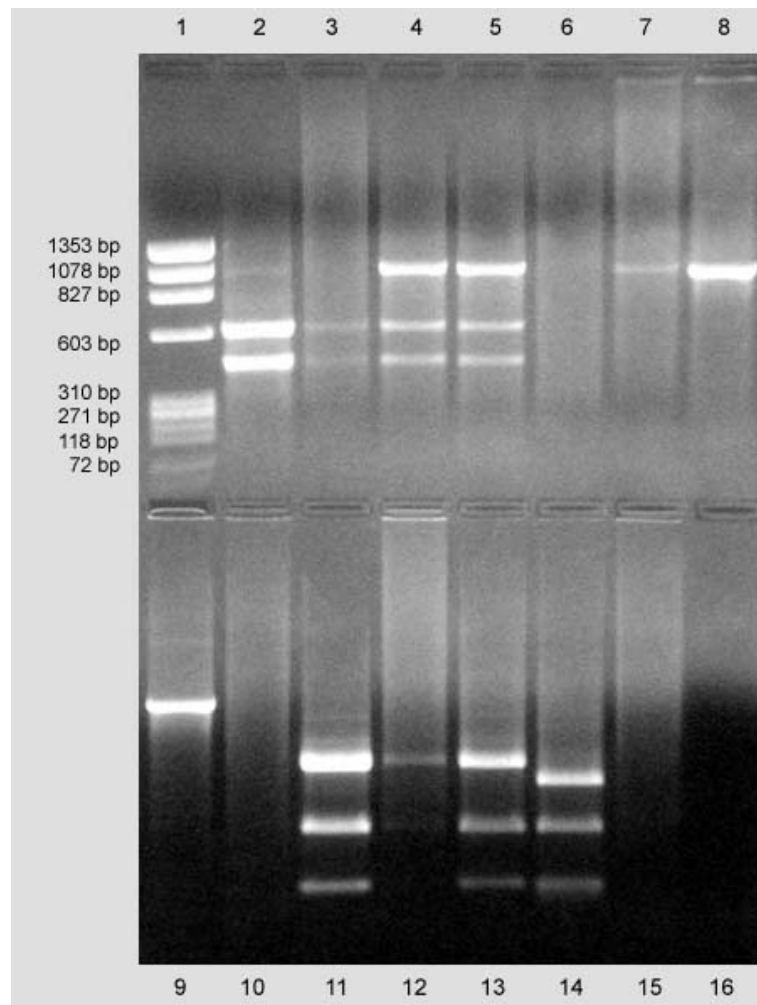


Abbildung 6: Restriktionsanalyse der PCR-Produkte aus den *Mycoplasma*-Isolaten von Schildkröten (16S-rRNA-PCR). Spur 1: Standardisierter Marker: Verdau von DNA des Bakteriophagen Phi X 174 mit dem Enzym „Hae III“. Spur 2: Positivkontrolle (PCR-Produkte aus *Mycoplasma agassizii*-PS6-Rein-DNA); Spur 3: Isolat 96-085; Spur 4: Isolat 96-095; Spur 5: Isolat 96-120 und Spur 6: PCR-negatives Isolat 96-125 mit Restriktionsendonuklease Age I. Spur 7: Isolat 96-085; Spur 8: Isolat 96-095; Spur 9: Isolat 96-120 und Spur 10: PCR-negatives Isolat 96-125 mit Restriktionsendonuklease Nci I. Spur 11: Positivkontrolle (*Mycoplasma agassizii*-PS6-Rein-DNA); Spur 12: Isolat 96-085; Spur 13: Isolat 96-095; Spur 14: Isolat 96-120 und Spur 15: PCR-negatives Isolat 96-125 mit Restriktionsendonuklease Sau96 I.

Tabelle 11: Restriktionsenzymanalyse der 16S-rRNS-PCR-Produkte aus den *Mycoplasma*-Isolaten von Schildkröten (Zusammenfassung).

Stamm bzw. Isolat.	Tierart	Fragmentgröße nach Verdau (bp)			
		Hae III	Age I	Nci I	Sau96 I
Referenz PS 6	GoAg	1047	617; 430	1047	596; 325; 126
96-009	TGG	1047	617; 430	1047	596; 325; 126
96-085	TGG	1047	617; 430	1047	596; 325; 126
96-086	TGG	1047	617; 430	1047	596; 325; 126
96-095	TGG	1047	617; 430	1047	596; 325; 126
96-118	TGI	1047	617; 430	1047	513; 83; 325; 126
96-120	TGI	1047	617; 430	1047	513; 83; 325; 126
96-121	TGI	1047	617; 430	1047	596; 325; 126
96-137	TGI	1047	617; 430	1047	513; 83; 325; 126

Die Restriktionsendonuklease Age I schneidet das 16S-rRNA-Gen von *Mycoplasma agassizii* vor dem Nukleotid an Position 625 und teilt deshalb das PCR-Produkt von 1047 bp in zwei Fragmente mit einer Länge von 617 und 430 bp. Die Restriktionsendonuklease Nci I schneidet das genannte PCR-Produkt an keiner Stelle, so daß es in seiner Länge (1047 bp) unverändert bleibt. Sau96 I zerlegt das PCR-Produkt aus *Mycoplasma agassizii* in drei Fragmente mit 596, 325 und 126 bp Länge.

Die Restriktionsanalyse ergab, daß der eingesetzte Referenzstamm PS6 stets die aufgrund der Datenbankeinträge für *Mycoplasma agassizii* erwarteten Bandenmuster erzeugte. Das PCR-Produkt aus Isolat 96-085 ließ sich im ersten Versuch nicht mit Sau96 I schneiden (Abb. 6). In einem zweiten Versuch erzeugte die Restriktion aber dasselbe Fragmentmuster wie bei Stamm PS6.

Insgesamt stimmten 5 *Mycoplasma*-Isolate (Nr. 96-009, 96-085, 96-086, 96-095 und 96-121) in ihren Restriktionsergebnissen vollständig mit dem Referenzstamm überein und wurden deshalb als Stämme von *Mycoplasma agassizii* angesprochen. Diese 5 Isolate stammten ausnahmslos von Schildkröten der Subspezies *Testudo graeca graeca* oder *Testudo graeca ibera*.

Bei drei Isolaten (Nr. 96-118, 96-120 und 96-137) gelang eine eindeutige Zuordnung zu *Mycoplasma agassizii* zunächst nicht. So konnten bei Einsatz von Age I und Nci I Restriktionsfragmente in den erwarteten Größen beobachtet werden. Bei der Verwendung von Sau96 I fehlte bei diesen Isolaten das Fragment mit 596 bp, anstelle davon wurden Fragmente mit einer Größe von 513 und 83 bp vorgefunden (Tabelle 11). Alle drei Isolate stammten von Maurischen Landschildkröten der Subspezies *Testudo graeca ibera*.

Diese drei Isolate, welche nicht eindeutig mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse als *Mycoplasma agassizii* identifiziert werden konnten, wurden von D. R. Brown (Universität von Florida, Gainesville, USA) und Dr. J. G. Tully (NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Frederick, USA) einer weiteren Charakterisierung unterzogen. Die Isolate 96-118, 96-120 und 96-137 konnten zunächst weder eindeutig *Mycoplasma agassizii* Stamm PS6 oder Utah C, noch *Mycoplasma testudinis* oder *Mycoplasma H3110* zugeordnet werden. Alle drei Isolate wuchsen in SP4-Medium und produzierten Säure aus Glukose. Ihr Metabolismus, ihr Wachstum und ihre Vermehrung auf SP4-Spezialagar wurden von polyklonalen

Antikörpern gegen die *Mycoplasma agassizii*-Stämme PS6 und Utah C, inhibiert. Fluoreszein-markierte Antikörper gegen den *Mycoplasma agassizii* – Stamm Utah C banden spezifisch an die Oberfläche der Kolonien aller drei Isolate, reagierten aber nicht mit Vertretern von 70 anderen Mykoplasmen-Spezies kreuz. Die Western-Blot-Analyse von lipidassoziierten Membranproteinen führte mit polyklonalen Antikörpern gegen den *Mycoplasma agassizii* – Stamm PS6 bei Stamm PS6 und den fraglichen Isolaten zu ähnlichen Bandenmustern. Somit konnte mit keiner dieser immunologischen Methoden ein signifikanter Unterschied zwischen den molekulargenetisch abweichenden *Mycoplasma*-Isolaten und *Mycoplasma agassizii*-Stamm PS6 festgestellt werden.

Daraufhin wurde bei zwei Isolaten (Isolate 96-120 und 96-137) eine komplette Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß das Adenosin an der Position 802 des 16S-RNA-Gens von *Mycoplasma agassizii*-Stamm PS6 (accession number U09786) bei den drei fraglichen *Mycoplasma*-Isolaten einheitlich fehlte. Die Deletion befand sich in der variablen Region 5 (V5) des Gens und damit in der mittels 16S-rRNA-PCR amplifizierten Region. Durch die Deletion ist bei diesen Isolaten an dieser Stelle die Sequenz G-G-A-C-C entstanden, die von der Restriktionsendonuklease Sau96 I als Zielsequenz erkannt wird. Dagegen weist der Stamm PS6 hier die für Sau 96 I unbedeutende Sequenz G-G-A-A-C-C auf, und das betreffende PCR-Produkt wird insgesamt nur zweimal von Sau96 I geschnitten. Die Punktmutation wurde als 16S-rRNS-Sequenzpolymorphismus innerhalb der Spezies interpretiert, und die *Mycoplasma*-Isolate 96-118, 96-120 und 96-137 als Vertreter von

„*Mycoplasma agassizii*-Stamm K120“ angesehen (BROWN et al., 1998). Die von Brown et al. ermittelte Nukleotidsequenz des 16S-rRNS-Gens von Stamm K120 ist unter dem Eintrag AF060821 in der GenBank hinterlegt.

#### **4.2.3 Auswertung der Ergebnisse der Untersuchungen auf Mykoplasmen in den Nasenspülproben mittels Kultivierung und PCR**

Da die kulturpositiven Schildkröten dieselben waren, deren Nasenspülproben in der Untersuchung auf Mykoplasmen mittels PCR positiv reagierten, erfolgte bei den statistischen und korrelativen Untersuchungen eine Gleichsetzung der getroffenen Aussagen über kultur-positive und PCR-positive Nasenspülproben.

Es erfolgte eine statistische Auswertung der Ergebnisse der Untersuchung auf Mykoplasmen mittels (Kultivierung und) PCR. Hierbei wurde zunächst das Mykoplasmen-PCR-Ergebnis aller Proben ermittelt, bevor eine weitere Differenzierung nach Aufenthaltsort, Alter und Geschlecht stattfand. Zur Untersuchung gelangten 329 Schildkröten. 321 Tiere wiesen in der Mykoplasmen-PCR ein negatives und 8 Schildkröten ein positives Ergebnis auf. Dies entsprach einer prozentualen Verteilung von 97,6 % negativen und 2,4 % positiven Tiere (Tabelle 12).

Tabelle 12: Nachweis von *Mycoplasma*-DNS in Nasenspülproben von Schildkröten (Ergebnisse der 16S-rRNS-PCR)

Untersuchte Schildkröten		
Ergebnis	Anzahl	% der Gesamtzahl
PCR negativ	321	97,6
PCR positiv	8	2,4
<b>Gesamt</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Daraufhin wurde eine Unterteilung der Proben in freilebende und in Gefangenschaft gehaltene Schildkröten vorgenommen. Hierbei ergaben sich bei 133 freilebenden Tieren nur negative Resultate, positive Mykoplasmen-PCR-Ergebnisse kamen ausschließlich bei in Gefangenschaft gehaltenen Tieren vor. Bei 196 in Gefangenschaft gehaltenen Tieren waren 188 negativ und 8 positiv. Das entsprach einem prozentualen Anteil von 95,9 % negativer und 4,1 % positiver Mykoplasmen-PCR-Ergebnisse in dieser Gruppe. Der Phi-Koeffizient betrug 0,130, somit bestand ein schwach positiver Zusammenhang zwischen den Variablen (Tabelle 13). Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von 0,018, war also als signifikant einzustufen.

Tabelle 13: Nachweis von *Mycoplasma*-DNS in Nasenspülproben von Schildkröten nach Aufenthaltsort der Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Ergebnisse der 16S-rRNS-PCR)

Untersuchte Schildkröten			
Ergebnis PCR	% innerhalb der Gruppe	Anzahl	% der Gesamtzahl
frei negativ	100,0	133	40,4
frei positiv	0	0	0
gefangen negativ	95,9	188	57,2
gefangen positiv	4,1	8	2,4
<b>gesamt</b>		<b>329</b>	<b>100,0</b>

Dann wurde eine weitere Unterteilung der Proben der in Gefangenschaft lebenden Schildkröten in unterschiedliche Subspezies vorgenommen (Tabelle 14). Hierbei ergaben sich bei 99 in Gefangenschaft gehaltenen THH 100 % negative Resultate. Bei 66 in Gefangenschaft lebenden TGG waren 62 (93,9 %) negativ und 4 (6,1 %) positiv. Bei 31 in Gefangenschaft lebenden TGI waren 27 Tiere negativ (87,1 %) und 4 Tiere positiv (12,9 %). Der Kontingenzkoeffizient betrug hier 0,2596 (~ 0,260), der maximale Wert

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}} = \sqrt{\frac{2-1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{2}} = 0,707,$$

d.h. es bestand ein positiver Zusammenhang zwischen den Variablen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Tabelle 14: Nachweis von *Mycoplasma*-DNS in Nasenspülproben von Schildkröten nach Subspezieszugehörigkeit und Status der Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Ergebnisse der 16S-rRNS-PCR)

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis PCR</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
THH und TGG frei negativ	100,0	133	40,4
THH und TGG frei positiv	0	0	0
THH gefangen negativ	100,00	99	30,0
THH gefangen positiv	0	0	0
TGG gefangen negativ	93,9	62	19,0
TGG gefangen positiv	6,1	4	1,2
TGI gefangen negativ	87,1	27	8,2
TGI gefangen positiv	12,9	4	1,2
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Eine weitere Differenzierung der Ergebnisse wurde aufgrund der Lokalisation der Tiere, deren Aufenthaltsdauer im Dorf und der Subspezies vorgenommen (Tabelle 15). Alle 4 gerade im Dorf angekommenen untersuchten THH waren negativ. Bei 42 länger als drei Monate im Dorf lebenden TGG waren 39 (92,9 %) negativ und 3 (7,1 %) positiv. Bei 24 gerade im Dorf angekommenen TGG waren 23 (95,8 %) negativ, 1 Tier (4,2 %) war positiv. Bei 24 länger als drei Monate im Dorf lebenden TGI waren 20 Tiere negativ (83,3 %) und 4 Tiere positiv (16,7 %). Bei 7 gerade im Dorf angekommenen TGI waren 7 negativ und 0 positiv. Der Kontingenzkoeffizient betrug hier 0,292, der maximale Wert

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}} = \sqrt{\frac{2-1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{2}} = 0,707,$$



d.h. es bestand ein positiver Zusammenhang zwischen den Variablen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Bei TGG überwogen bei den länger als drei Monaten im Dorf lebenden Tieren die positiven Ergebnisse der gerade angekommenen Tiere. Noch deutlicher zeigte sich die gesteigerte Anzahl an positiven Ergebnissen bei länger als drei Monate im Dorf lebenden TGI gegenüber gerade angekommenen TGI. Hierbei war die Anzahl der positiven Ergebnisse bei schon länger im Dorf lebenden TGG und TGI größer als bei gerade im Dorf angekommenen TGG und TGI.

Tabelle 15: Nachweis von *Mycoplasma*-DNS in Nasenspülproben von Schildkröten nach Subspezieszugehörigkeit und Aufenthaltsort der Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Ergebnisse der 16S-rRNS-PCR)

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis PCR</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
THH Dorf negativ	100	95	29,0
THH Dorf positiv	0	0	0
THH g.a.negativ	100	4	1,2
THH g.a. positiv	0	0	0
THH frei negativ	100	93	28,0
THH frei positiv	0	0	0
TGG Dorf negativ	92,9	39	12,0
TGG Dorf positiv	7,1	3	0,9
TGG g.a.negativ	95,8	23	7,0
TGG g.a. positiv	4,2	1	0,3
TGG frei negativ	100	40	12,2
TGG frei positiv	0	0	0
TGI Dorf negativ	83,3	20	6,1
TGI Dorf positiv	16,7	4	1,2
TGI g.a.negativ	100	7	2,1
TGI g.a. positiv	0	0	0
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Weiterhin wurde der Einfluß des Geschlechtes, bzw. des Alters der getesteten Tiere auf das Ergebnis der Mykoplasmen-PCR untersucht (Tabelle 16). Hierbei fiel auf, daß ausschließlich adulte Schildkröten eine positive Mykoplasmen-PCR in den vorgenommenen Untersuchungen aufweisen. 30 untersuchte Jungtiere zeigten alle ein negatives Ergebnis in dieser Untersuchung.

Bei den adulten Tieren zeigte nur ein männliches von 136 getesteten und 7 weibliche von 163 untersuchten Tieren ein positives Mykoplasmen-PCR-Ergebnis. Dies entsprach einer prozentualen Verteilung von 99,3 % negativen und 0,7 % positiven Tieren innerhalb der männlichen Gruppe; bzw. 95,7 % negativen und 4,3 % positiven Tieren innerhalb der weiblichen Gruppe. Bei Berechnung der Signifikanz der Mykoplasmen-PCR-Ergebnisse zwischen männlichen und weiblichen Tieren hatte die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  einen Wert von 0,058, war also als nicht signifikant einzustufen. Bei Berechnung der Signifikanz der Mykoplasmen-PCR-Ergebnisse zwischen adulten und juvenilen Tieren hatte die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  einen Wert von 0,366, somit war auch hier der Einfluß des Alters als nicht signifikant zu bezeichnen.

Tabelle 16: Mykoplasmen-PCR- Ergebnisse der Nasenspülproben in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Schildkröten

<b>Ergebnis PCR</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>
männlich negativ	99,3	135
männlich positiv	0,7	1
weiblich negativ	95,7	156
weiblich positiv	4,3	7
juvenil negativ	100	30
juvenil positiv	0	0
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>

#### 4.2.4 Serologische Untersuchung auf Mykoplasmen-Antikörper mittels ELISA

Der Antikörpergehalt der Blutplasma-Proben gegen Mykoplasmen wurde in der sogenannten ELISA-Ratio angegeben. Als **positiv** für *Mycoplasma agassizii* spezifische Antikörper wurden jene Proben angesehen, bei denen die **ELISA-Ratio**  $\geq 3$  betrug. Als zweifelhaft, bzw. **fraglich** zu beurteilen galten die Proben mit einem Wert **zwischen 2 und 3**, als **negativ** waren die Proben mit einer **ELISA-Ratio** von  $\leq 2$  einzustufen.

Zunächst wurde das Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis aller Proben ermittelt, bevor eine weitere Differenzierung nach Aufenthaltsort, Alter und Geschlecht stattfand. Zur Untersuchung gelangten 329 Schildkröten. 173 Schildkröten (52,6 %) wiesen im Mykoplasmen-ELISA ein negatives, 102 Tiere (31,0 %) ein positives und 54 (16,4 %) ein fragliches Ergebnis auf (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht über das Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis aller Schildkröten

Ergebnis	Anzahl	% der Gesamtzahl
ELISA negativ	173	52,6
ELISA positiv	102	31,0
ELISA fraglich	54	16,4
<b>Gesamt</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Daraufhin wurde eine Unterteilung der Ergebnisse in freilebende und in Gefangenschaft gehaltene Schildkröten vorgenommen (Tabelle 18). Hierbei

ergaben sich bei 133 freilebenden Tieren 76 (57,1 %) negative, 29 (21,8 %) positive und 28 (21,1 %) fragliche Resultate. Bei 196 in Gefangenschaft lebenden Tieren waren 97 (49,5 %) negativ, 73 (37,2 %) positiv und 26 (13,3 %) fraglich. Bei diesen Variablen mußte ein Koeffizient für nominalskalierte Merkmale verwendet werden; verwendet wurde der Kontingenzkoeffizient  $\underline{C}$ . Er lieferte hier den Wert 0,171. Bei Unabhängigkeit der Merkmale nahm er den Wert 0 an, sein Maximalwert betrug

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}}$$

mit  $m = \min(\underline{r} = \text{Anzahl Zeilen und } \underline{c} = \text{Anzahl Spalten})$ . In diesem Fall gab es 3 Zeilen (negativ, positiv und fraglich) und 2 Spalten (frei und gefangen). Somit betrug

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{2-1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{2}} = 0,707.$$

Hier lag also ein schwach positiver Zusammenhang zwischen den Variablen vor, d.h. ein positiver Test lag mit einer größeren Wahrscheinlichkeit bei einem gefangenen Tier vor, als ein negativer Test bei einem freilebenden Tier. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von 0,007, war also als signifikant einzustufen.

**Tabelle 18:** Zusammenhang zwischen der Lebensweise der Schildkröten und ihrem Befund im Mykoplasmen-ELISA

<b>Ergebnis ELISA</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
frei negativ	57,1	76	23,1
frei positiv	21,8	29	8,8
frei fraglich	21,1	28	8,5
gefangen negativ	49,5	97	29,5
gefangen positiv	37,2	73	22,2
gefangen fraglich	13,3	26	7,9
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Daraufhin wurde eine weitere Unterteilung der Ergebnisse der freilebenden und in Gefangenschaft lebenden Schildkröten nach Subspezies vorgenommen (Tabelle 19). Hierbei ergaben sich bei 93 freilebenden THH 68 (73,1 %) negative, 11 (11,8 %) positive und 14 (15,1 %) fragliche Resultate. Bei 40 freilebenden TGG waren 8 (20,0 %) negativ, 18 (45,0 %) positiv und 14 (35,0 %) fraglich. Bei 99 gefangenen THH ergaben sich 70 (70,7 %) negative, 10 (10,1 %) positive und 19 (19,2 %) fragliche Resultate. Bei 66 in Gefangenschaft lebenden TGG waren 20 (30,3 %) negativ, 42 (63,6 %) positiv und 4 (6,1 %) fraglich. Bei 31 in Gefangenschaft lebenden TGI waren 7 Tiere negativ (22,6 %), 21 Tiere positiv (67,7 %) und 3 Tiere fraglich (9,7 %). Der Kontingenzkoeffizient C betrug  $C = 0,441$  mit

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}} = \sqrt{\frac{3-1}{3}} = \sqrt{\frac{2}{3}} = 0,816,$$

d.h. der Zusammenhang war hier ebenfalls positiv und größer als im vorangegangenen Fall. So war bei freilebenden THH die Wahrscheinlichkeit für ein signifikant positives Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis geringer als bei freilebenden TGG. Auch bei in Gefangenschaft lebenden THH war die Wahrscheinlichkeit für ein signifikant positives Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis geringer als bei in Gefangenschaft lebenden TGG, welche in dieser Beziehung noch von TGI übertroffen werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen der (Sub)-Spezies-Zugehörigkeit, der Lebensweise der Schildkröten und ihrem Befund im Mykoplasmen-ELISA

<b>Ergebnis ELISA</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
THH frei negativ	73,1	68	20,6
THH frei positiv	11,8	11	3,3
THH frei fraglich	15,1	14	4,3
TGG frei negativ	20,0	8	2,4
TGG frei positiv	45,0	18	5,5
TGG frei fraglich	35,0	14	4,3
THH gefangen negativ	70,7	70	21,3
THH gefangen positiv	10,1	10	3,0
THH gefangen fraglich	19,2	19	5,8
TGG gefangen negativ	30,3	20	6,1
TGG gefangen positiv	63,6	42	12,8
TGG gefangen fraglich	6,1	4	1,2
TGI gefangen negativ	22,6	7	2,1
TGI gefangen positiv	67,7	21	6,4
TGI gefangen fraglich	9,7	3	0,9
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Eine weitere Differenzierung der Ergebnisse wurde aufgrund der Lokalisation der Tiere, deren Aufenthaltsdauer im Dorf und nach Subspezies vorgenommen (Tabelle 20). Hierbei ergaben sich bei 95 länger als drei Monate im Dorf lebenden THH 69 (73 %) negative, 8 (8 %) positive und 18 (19 %) fragliche Mykoplasmen-ELISA-Resultate. Bei 4 gerade im Dorf angekommenen THH war ein Tier negativ, zwei Tiere positiv und ein Tier fraglich. Bei 42 länger als drei Monate im Dorf lebenden TGG waren 6 Tiere (14 %) negativ, 34 (81 %) positiv und zwei (5 %) fraglich. Bei 24 gerade im Dorf angekommenen TGG waren 14 (59 %) negativ, 8 (33 %) positiv und zwei (8 %) fraglich. Bei 24 länger als drei Monate im Dorf lebenden TGI waren 3 Tiere negativ (12,5 %); 18 Tiere positiv (75 %) und 3 Tiere fraglich (12,5 %). Bei 7 gerade im Dorf angekommenen TGI waren 4 (57,1 %) negativ, drei (42,9 %) positiv und 0 (0 %) fraglich.

Hierbei betrug der Kontingenzkoeffizient  $C = 0,541$ , der Wertebereich lag zwischen 0 und

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}} = \sqrt{\frac{3-1}{3}} = \sqrt{\frac{2}{3}} = 0,816,$$

es bestand damit ebenfalls ein positiver Zusammenhang. So war auffallend, daß schon länger im Dorf lebende THH bei den vorgenommenen Untersuchungen prozentual gesehen wesentlich seltener ein positives Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis erzielten als gerade im Dorf angekommene THH. Anders verhielt es sich bei TGG. Dort überwogen bei länger als drei Monaten im Dorf lebenden Tieren die positiven Ergebnisse der gerade angekommenen Tiere. Noch deutlicher zeigte sich die gesteigerte Anzahl an

---

positiven Ergebnissen bei länger als drei Monate im Dorf lebenden TGI gegenüber gerade angekommenen TGI. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Ebenso war ein weiteres entscheidendes Resultat der Untersuchungen ersichtlich: Von 93 untersuchten freilebenden THH in Frankreich waren 68 Tiere (73,1 %) negativ, 11 Tiere (11,8 %) positiv und 14 (15,1 %) fraglich. Bei 40 freilebenden untersuchten TGG in Marokko waren 8 Tiere (20 %) negativ, 18 Tiere (45 %) positiv und 14 Tiere (35 %) fraglich. Somit ließ sich feststellen, daß prozentual gesehen die positiven Ergebnisse bei freilebenden THH wesentlich geringer als bei freilebenden TGG waren. Dies zeigte sich an den Prozentzahlen innerhalb der Gruppe der THH, bzw. TGG und am Prozentsatz der Gesamtzahl positiver Ergebnisse beider Subspezies.



Tabelle 20: Zusammenhang zwischen der (Sub)-Spezies-Zugehörigkeit, der Lebensweise und der Lokalisation der Schildkröten und ihrem Befund im Mykoplasmen-ELISA

<b>Ergebnis ELISA</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
THH Dorf negativ	73,0	69	21,0
THH Dorf positiv	8,0	8	2,4
THH Dorf fraglich	19,0	18	5,5
THH g.a.negativ	25,0	1	0,3
THH g.a. positiv	50,0	2	0,6
THH g.a. fraglich	25,0	1	0,3
THH frei negativ	73,1	68	20,7
THH frei positiv	11,8	11	3,3
THH frei fraglich	15,1	14	4,3
TGG Dorf negativ	14,0	6	1,8
TGG Dorf positiv	81,0	34	10,3
TGG Dorf fraglich	5,0	2	0,6
TGG g.a.negativ	59,0	14	4,3
TGG g.a. positiv	33,0	8	2,4
TGG g.a. fraglich	8,0	2	0,6
TGG frei negativ	20,0	8	2,4
TGG frei positiv	45,0	18	5,5
TGG frei fraglich	35,0	14	4,3
TGI Dorf negativ	12,5	3	0,9
TGI Dorf positiv	75,0	18	5,5
TGI Dorf fraglich	12,5	3	0,9
TGI g.a.negativ	57,1	4	1,2
TGI g.a. positiv	42,9	3	0,9
TGI g.a. fraglich	0	0	0
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Weiterhin wurde der Einfluß des Geschlechtes, bzw. des Alters der getesteten Tiere auf den Minimal-, Maximal- und Mittelwert des Mykoplasmen-ELISA untersucht (Tabelle 21). Hierbei fiel auf, daß der Maximal- und der Mittelwert der Jungtiere wesentlich unter dem der erwachsenen Schildkröten lag, während der Maximal- und der Mittelwert der männlichen und weiblichen Schildkröten

sehr nahe beieinander lagen. Bei Berechnung der Signifikanz der Mykoplasmen-ELISA-Ratio zwischen männlichen und weiblichen Tieren hatte die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  einen Wert von 0,916; war also als nicht signifikant einzustufen. Bei Berechnung der Signifikanz der Mykoplasmen-ELISA-Ratio zwischen adulten und juvenilen Tieren ergab sich ein Wert von 0,027; somit war hier der Einfluß des Alters als signifikant zu bezeichnen.

Tabelle 21: Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie Standardabweichungen im Mykoplasmen-ELISA in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Tiere

<b>Mykoplasmen ELISA</b>				
<b>Geschlecht und Alter</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
männlich	0,83	15,93	3,39	3,37
weiblich	0,77	16,28	3,35	3,37
juvenil	0,79	3,96	1,69	0,79

Weiterhin wurde eine Auflistung der Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie der Standardabweichung des Mykoplasmen-ELISA in Abhängigkeit der Schildkrötenspezies und Aufenthaltsort der getesteten Tiere zum Zeitpunkt der Beprobung vorgenommen (Tabelle 22). So konnte bei freilebenden THH eine ELISA-Ratio mit einem Mittelwert von 1,73 festgestellt werden. Über drei Monate im Dorf befindliche THH erzielten Mittelwerte von 1,81. Bei gerade im Dorf angekommenen THH konnte im Mittel eine ELISA-Ratio von 3,90 festgestellt werden. Freilebende TGG wiesen einen Mittelwert von 3,30 auf. Über drei Monate im Dorf befindliche TGG erzielten Mittelwerte von 7,28. Bei gerade im Dorf angekommenen TGG konnte im Mittel eine ELISA-Ratio von

4,24 festgestellt werden. Über drei Monate im Dorf befindliche TGI erzielten Mittelwerte von 6,10. Bei gerade im Dorf angekommenen TGI konnte im Mittel eine ELISA-Ratio von 3,40 festgestellt werden. Auffällig war hierbei, daß untersuchte THH insgesamt niedrigere Mykoplasmen-ELISA-Mittelwerte als TGG und TGI aufwiesen. Sowohl bei THH als auch bei TGG fiel auf, daß freilebende Tiere einen niedrigeren Mykoplasmen-ELISA-Mittelwert aufwiesen als in Gefangenschaft gehaltene Tiere. Weiterhin war ersichtlich, daß länger als drei Monate im Dorf befindliche TGG und TGI höhere Mykoplasmen-ELISA-Mittelwerte erreichten als gerade im Dorf angekommene Tiere. Bei THH verhielt es sich umgekehrt. Dort wiesen die gerade im Dorf angekommenen Tiere einen höheren Mykoplasmen-ELISA-Mittelwert auf als länger als drei Monate im Dorf befindliche Schildkröten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Tabelle 22: Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie Standardabweichungen im Mykoplasmen-ELISA in Abhängigkeit von Subspezies und Aufenthaltsort der Tiere

<b>Mykoplasmen ELISA</b>				
<b>Subspezies und Lokalisation</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
THH frei	0,77	4,51	1,73	0,88
THH Dorf	0,79	7,70	1,81	1,05
THH G.A.	1,59	6,80	3,90	2,48
TGG frei	1,25	8,89	3,30	1,62
TGG Dorf	0,94	16,28	7,28	4,73
TGG G.A.	0,83	12,86	4,24	4,56
TGI Dorf	1,13	15,31	6,10	4,13
TGI G.A.	0,92	10,44	3,40	3,56

### **4.3 Auswertung der Untersuchungen auf Herpesviren**

#### **4.3.1 Untersuchung der Tupferproben auf Herpesvirus mittels Zellkultur**

Zum Nachweis von Herpesviren wurden insgesamt 658 Tupferproben auf Terrapene-Herz-Zellkulturen (TH1) untersucht, wobei es sich hierbei um 329 Maulhöhlentupfer und 329 Kloakentupfer handelte. Im Falle eines zytopathischen Effekt (CPE) wurden die Isolate mit Chloroform und IUDR getestet und eine elektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt.

Von 329 zur Untersuchung gelangten Schildkröten wiesen 328 (99,7 %) Tiere in der Zellkultur ein negatives und eine Schildkröte (0,3 %) ein positives Ergebnis auf.

Bei den untersuchten Tupferproben konnte nur bei einer weiblichen TGI (Probe 97-1) aus dem Schildkrötendorf, die bei Probenentnahme Rhinitis und Stomatitis zeigte und wenige Tage danach starb, ein zytopathogenes Agens isoliert werden. Das zytopathogene Agens wurde sowohl aus dem Maulhöhlen- als auch aus dem Kloakentupfer dieser Schildkröte isoliert.

Die Isolate beider Tupferproben verloren durch die Behandlung mit Chloroform vollständig ihre Infektiosität. Somit hatten beide Isolate einen Lipidanteil in ihrer Hülle. Das Isolat aus dem Maulhöhlentupfer wies in der Zellkultur einen Virusgehalt von  $10^{3,6}$  KID<sub>50</sub> je ml auf, das Isolat des Kloakentupfers einen Virusgehalt von  $10^{4,9}$  KID<sub>50</sub> je ml. Nach Zusatz von 50 µg/ml 5-Jod-2-Desoxy-Uridin (IUDR) zum Zellkulturmedium wurde ein Virusgehalt von  $10^{2,6}$  im

Maulhöhlentupferisolat und ein Virusgehalt von  $10^{3,9}$  im Kloakentupferisolat festgestellt. Somit bestand ein numerischer Unterschied von einer Zehner-Log-Stufe in Anwesenheit von IUDR bei beiden Isolaten (Tabelle 23).

Tabelle 23: Einfluß von Chloroformbehandlung und Kultivierung mit IUDR auf den Virusgehalt in TH1-Zellkulturen

Tupferprobe	CPE ohne Chloroform	CPE mit Chloroform	KID <sub>50</sub> je ml in log 10	
			ohne IUDR	mit IUDR
97-1 Maulhöhle	ja	nein	3,6	2,6
97-1 Kloake	ja	nein	4,9	3,9

Daraufhin erfolgte die Berechnung der Präzision der Virustitration (Varianzen der KID<sub>50</sub>-Werte je ml). Die Präzision der Virustitration der Maulhöhlentupferprobe ohne und mit Zusatz von IUDR zeigte eine Varianz von 0,17. Für die Kloakentupferprobe zeigte sich bei der Berechnung der Präzision der Virustitration ohne und mit Zusatz von IUDR eine Varianz von 0,25. Bei Annahme normalverteilter Werte ergab sich ein U-Wert von 1,42 für die Maulhöhlentupferproben ohne und mit IUDR-Zusatz und ein U-Wert von 1,41 für die Kloakentupferproben ohne und mit Zusatz von IUDR. Damit waren die nach Zusatz von IUDR festgestellten Unterschiede nach Berechnung als nicht signifikant zu bezeichnen.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Überstandes der mit Kloakaltupfermaterial infizierten TH1-Zellkultur waren virale Partikel mit ikosaederförmigen Cores sichtbar. Die Cores hatten dabei einen Durchmesser

von ca. 90 nm (Abbildung 7). Komplette Virionen mit Envelope konnten gefunden, aber nicht fotografisch festgehalten werden. Aufgrund von Morphologie und Größe der Partikel wurde das gefundene Isolat der Familie der Herpesviren zugeordnet.

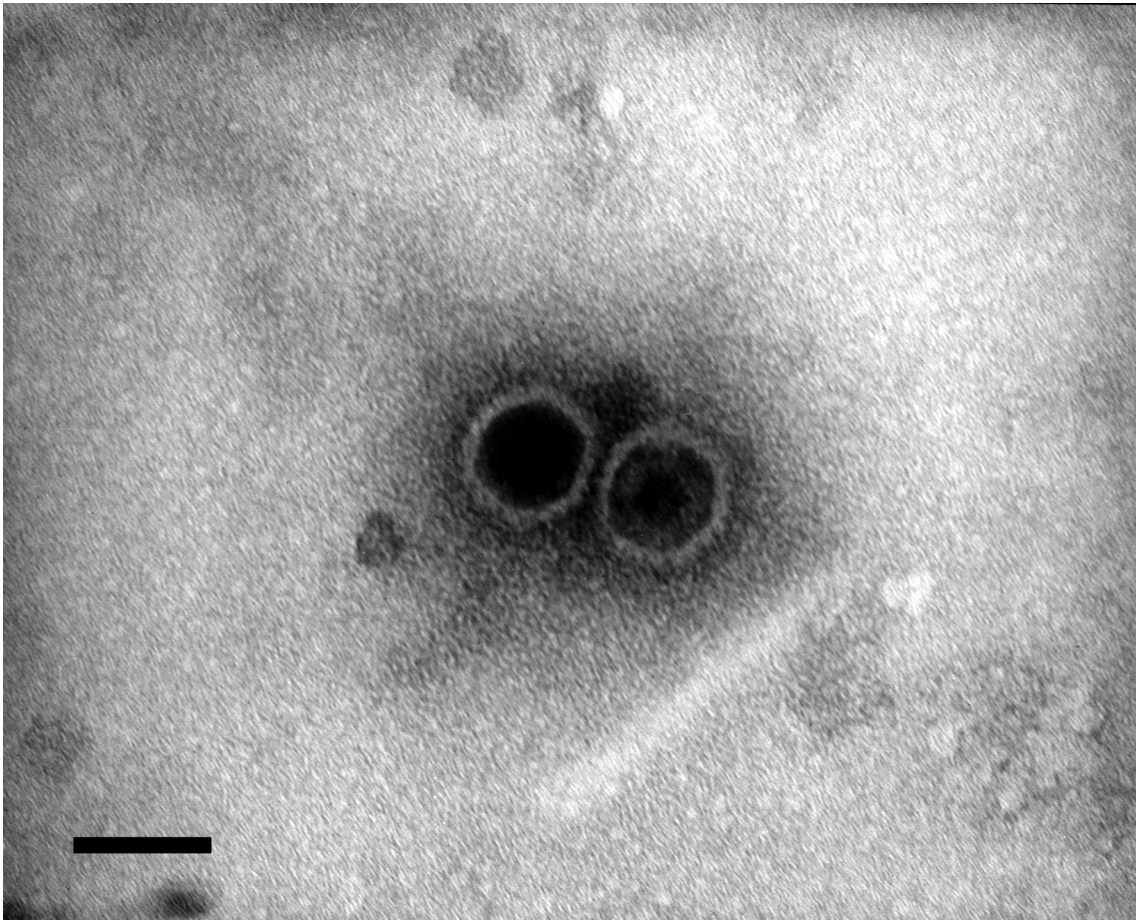


Abbildung 7: Herpesvirusisolat 97-1 aus dem Kloakentupfer einer *Testudo graeca iberica* im TH1-Zellkulturüberstand. Elektronenmikroskopische Aufnahme nach Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure; 85.000fache Vergrößerung; Balken entspricht 100 nm.

#### 4.3.2 Serologische Untersuchung auf Herpesvirus-Antikörper mittels Herpesvirus-Neutralisationstest

Einen Überblick über die im Herpesvirus-Neutralisationstest positiven Plasmaproben gibt Tabelle 24.

Tabelle 24: Herpesvirus-NT-Ergebnis der Proben, Aufgliederung nach verwendetem Virus-Antigen

1996 und 1997 untersuchte Schildkröten					
Subspp.	Lebensraum	G	Anzahl im NT positiver Proben		
			770/95	2245/92	*17/96
THH	Schildkrötendorf	30 M	0	0	0
		35 W	0	0	0
		30 J	0	0	0
	G.A.	2 M	0	0	0
		2 W	0	0	0
	freilebend	40 M	0	0	0
		53 W	0	0	0
TGG	Schildkrötendorf	21 M	8	8	8
		22 W	6	6	5
	G.A.	13 M	2	2	2
		10 W	0	0	0
	freilebend	15 M	0	0	0
		25 W	0	0	0
TGI	Schildkrötendorf	10 M	10	10	10
		14 W	11	11	10
	G.A.	5 M	2	2	2
		2 W	0	0	0
<b>gesamt</b>		<b>329</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>37</b>

Abkürzungen: G = Geschlecht; G.A. = gerade angekommen; J = juvenil (Carapaxlänge von nicht mehr als 10 cm ); M = männlich; Subspp. = Subspezies; W = weiblich

Im NT wurden drei verschiedene Virusisolate verwendet: Virus 2245/92, Virus 770/95 und Virus \*17/96. Die in Tabelle 25 aufgeführten Titer der Neutralisationsteste wurden nach der vereinfachten Labormethode nach Reed und Muench (MAYR et al., 1977) mathematisch ausgewertet. Interessant ist, daß bis auf zwei Proben bei allen drei Virusisolaten ein Titer verzeichnet werden konnte. Nur Proben 96-20 und 96-125 erzielten ein negatives Ergebnis im NT mit Virus \*17/96 bei gleichzeitig positivem NT mit den anderen beiden Virusisolaten (Tabelle 24 und Tabelle 25).

Tabelle 25: Nachweis Herpesvirus-neutralisierender Antikörper bei

Schildkröten. Ergebnisse der positiven Reagenten im Detail

N°	Probe	Subsp.	G	Neutralisationstiter mit			Herpesvirus- Isolierung aus
				Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245/92	Herpes NT *17/96	Tupferprobe bukkal / kloakal
1	96-6	TGG	W	362	181	45	negativ
2	96-16	TGG	M	91	45	32	negativ
3	96-20	TGG	W	6	3	negativ	negativ
4	96-82	TGG	W	23	45	23	negativ
5	96-83	TGG	W	64	32	23	negativ
6	96-91	TGG	W	64	23	45	negativ
7	96-94	TGG	W	91	11	64	negativ
8	96-101	TGG	M	362	45	45	negativ
9	96-102	TGG	M	362	181	181	negativ
10	96-103	TGG	M	45	6	6	negativ
11	96-104	TGG	M	32	11	23	negativ
12	96-106	TGG	M	724	23	91	negativ
13	96-107	TGG	M	23	6	11	negativ
14	96-108	TGG	M	91	11	16	negativ
15	96-109	TGG	M	45	23	23	negativ
16	96-110	TGG	M	23	11	32	negativ
17	96-116	TGI	W	362	45	23	negativ
18	96-117	TGI	W	181	181	91	negativ
19	96-118	TGI	W	64	32	64	negativ



N°	Probe	Subspp.	G	Neutralisationstiter mit			Herpesvirus- Isolierung aus
				Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245/92	Herpes NT *17/96	Tupferprobe bukkal / kloakal
20	96-119	TGI	W	181	32	64	negativ
21	96-120	TGI	W	128	23	23	negativ
22	96-121	TGI	W	181	32	23	negativ
23	96-123	TGI	W	181	16	64	negativ
24	96-124	TGI	W	45	16	32	negativ
25	96-125	TGI	W	45	8	negativ	negativ
26	96-128	TGI	W	45	6	4	negativ
27	96-135	TGI	M	91	11	11	negativ
28	96-136	TGI	M	362	45	91	negativ
29	96-137	TGI	M	64	16	11	negativ
30	96-138	TGI	M	181	45	45	negativ
31	96-139	TGI	M	362	45	45	negativ
32	96-140	TGI	M	23	23	23	negativ
33	96-141	TGI	M	45	91	45	negativ
34	96-142	TGI	M	23	45	16	negativ
35	96-143	TGI	M	23	11	11	negativ
36	96-144	TGI	M	8	8	4	negativ
37	96-147	TGI	M	45	16	8	negativ
38	96-179	TGI	M	33	6	4	negativ
39	97-1	TGI	W	135	9	9	positiv

Abkürzungen: G = Geschlecht; M = männlich; Subspp. = Subspezies; W = weiblich

In den Neutralisationstests des Virus 770/95 und des Virus 2245/92 waren 39 (11,9 %) Tiere positiv und 290 (88,1 %) Tiere negativ. Im NT des Virus \* 17/96 wiesen nur 37 Tiere (11,2 %) ein positives Ergebnis auf, 292 (88,8 %) waren negativ.

Daraufhin wurden die Minimal-, Maximal- und Mittelwerte und die Standardabweichung der positiven Herpesvirus-NT-Ergebnisse der drei unterschiedlichen Virusisolate verglichen. Im Vergleich der Herpesvirus-NT-Titer erreichte der NT mit Virus 770/95 einen Mittelwert von 15,85, der NT mit

Virus 2245/92 einen Mittelwert von 4,31 und der NT mit Virus \*17/96 einen Mittelwert von 4,17 (Tabelle 26).

Tabelle 26: Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie Standardabweichungen im Herpesvirus-NT

<b>Herpes NT</b>				
<b>Virusisolat</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Virus 770	6	724	15,85	67,52
Virus 2245	3	181	4,31	19,56
Virus *17/96	4	181	4,17	16,47

Im Folgenden sind die als positiv bezeichneten Ergebnisse jene Proben, welche bei mindestens zwei von drei im Neutralisationstest eingesetzten Virusisolaten in der Lage waren, das Virus zu neutralisieren.

Von 329 Schildkröten wiesen 290 (88,1 %) Schildkröten im Herpesvirus-NT ein negatives und 39 (11,9 %) Tiere ein positives Ergebnis auf (Tabelle 27).

Tabelle 27: Übersicht über das Herpesvirus-NT-Ergebnis aller Schildkröten

<b>Untersuchte Schildkröten</b>		
<b>Ergebnis</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
Herpesvirus-NT negativ	290	88,1
Herpesvirus-NT positiv	39	11,9
<b>Gesamt</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Daraufhin wurde eine Unterteilung der Proben in freilebende und in Gefangenschaft gehaltene Schildkröten vorgenommen. Hierbei ergaben sich

bei 133 freilebenden Tieren nur negative Resultate. Bei 196 in Gefangenschaft lebenden Tieren waren 157 (80,1 %) negativ und 39 (19,9 %) positiv (Tabelle 28). Der Phi-Wert betrug hier 0,302, d.h. es bestand ein positiver Zusammenhang zwischen dem Ergebnis des Herpesvirus-NT und dem Lebensraum der Schildkröten (Wertebereich zwischen 0 und 1). Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Tabelle 28: Zusammenhang zwischen der Lebensweise der Schildkröten und ihrem Befund im Herpesvirus-NT

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis NT</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
frei negativ	100	133	40,4
frei positiv	0	0	0
gefangen negativ	80,1	157	47,7
gefangen positiv	19,9	39	11,9
<b>gesamt</b>	-	329	100,0

Daraufhin wurde eine weitere Unterteilung der Proben der freilebenden und in Gefangenschaft lebenden Schildkröten in unterschiedliche Subspezies vorgenommen (Tabelle 29). Hierbei ergaben sich weder bei 93 getesteten freilebenden THH, noch bei 40 getesteten freilebenden TGG positive Resultate. Auch 99 getestete in Gefangenschaft lebende THH erzielten keine positiven Resultate. Bei 66 in Gefangenschaft lebenden TGG waren 50 (75,8 %) negativ und 16 (24,2 %) positiv. Bei 31 in Gefangenschaft lebenden TGI waren 8 (25,8 %) Tiere negativ und 23 (74,2 %) Tiere positiv.

Der Kontingenzkoeffizient betrug hier 0,567, der maximale Wert

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}} = \sqrt{\frac{2-1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{2}} = 0,707,$$

d.h. es bestand ein stark positiver Zusammenhang zwischen den Variablen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Weder bei freilebenden THH noch freilebenden TGG ergaben sich positive Resultate. In Gefangenschaft lebende THH erzielten bei den vorgenommenen Untersuchungen seltener ein positives Herpesvirus-NT-Ergebnis als in Gefangenschaft lebende TGG, welche in dieser Beziehung noch von TGI übertroffen wurden.

Tabelle 29: Zusammenhang zwischen der (Sub)-Spezies-Zugehörigkeit, der Lebensweise der Schildkröten und ihrem Befund im Herpesvirus-NT

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis NT</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
THH frei negativ	100,0	93	28,2
THH frei positiv	0	0	0
TGG frei negativ	100,0	40	12,2
TGG frei positiv	0	0	0
THH gefangen negativ	100,0	99	30,1
THH gefangen positiv	0	0	0
TGG gefangen negativ	75,8	50	15,2
TGG gefangen positiv	24,2	16	4,9
TGI gefangen negativ	25,8	8	2,4
TGI gefangen positiv	74,2	23	7,0
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Eine weitere Differenzierung der Ergebnisse wurde aufgrund der Lokalisation der Tiere, deren Aufenthaltsdauer im Dorf und der unterschiedlichen Subspezies vorgenommen (Tabelle 30). Bei 42 länger als drei Monate im Dorf lebenden TGG waren 28 (66,7 %) negativ und 14 (33,3 %) positiv. Bei 24 gerade im Dorf angekommenen TGG waren 22 (91,7 %) negativ und 2 Tiere (8,3 %) positiv. Bei 24 länger als drei Monate im Dorf lebenden TGI waren 3 Tiere (12,5 %) negativ und 21 Tiere (87,5 %) positiv. Bei 7 gerade im Dorf angekommenen TGI waren 5 (71,4 %) negativ und 2 (28,6 %) positiv.

Der Kontingenzkoeffizient betrug hier 0,598, der maximale Wert

$$C_{\max} = \sqrt{\frac{m-1}{m}} = \sqrt{\frac{2-1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{2}} = 0,707,$$

d.h. es bestand ein stark positiver Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen.

Tiere, die länger als drei Monate im Schildkrötendorf lebten, zeigten signifikant häufiger ein positives Ergebnis als gerade angekommene Tiere. Noch deutlicher zeigte sich die gesteigerte Anzahl an positiven Ergebnissen bei länger als drei Monate im Dorf lebenden TGI gegenüber gerade angekommenen TGI.

Tabelle 30: Zusammenhang zwischen der (Sub)-Spezies-Zugehörigkeit, der Lebensweise und der Lokalisation der Schildkröten und ihrem Befund im Herpesvirus-NT

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis NT</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
THH Dorf negativ	100,0	95	28,9
THH Dorf positiv	0	0	0,0
THH g.a.negativ	100,0	4	1,2
THH g.a. positiv	0	0	0,0
THH frei negativ	100,0	93	28,2
THH frei positiv	0	0	0
TGG Dorf negativ	66,7	28	8,5
TGG Dorf positiv	33,3	14	4,3
TGG g.a.negativ	91,7	22	6,7
TGG g.a. positiv	8,3	2	0,6
TGG frei negativ	100,0	40	12,2
TGG frei positiv	0	0	0
TGI Dorf negativ	12,5	3	0,9
TGI Dorf positiv	87,5	21	6,4
TGI g.a.negativ	71,4	5	1,5
TGI g.a. positiv	28,6	2	0,6
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Weiterhin wurde der Einfluß des Geschlechtes, bzw. des Alters der getesteten Tiere auf das Ergebnis des Herpesvirus-NT untersucht (Tabelle 31). Hierbei fiel auf, daß ausschließlich adulte Schildkröten einen positiven Herpesvirus-NT in den vorgenommenen Untersuchungen aufwiesen, 30 untersuchte Jungtiere zeigten alle ein negatives Ergebnis in dieser Untersuchung. Bei adulten Tieren zeigten nur 22 (16,2 %) von 136 getesteten männlichen Schildkröten und 17 (10,4 %) weibliche von 163 untersuchten Tieren ein positives Herpesvirus-NT-

Ergebnis. Bei Berechnung der Signifikanz der Herpesvirus-NT-Ergebnisse zwischen männlichen und weiblichen Tieren hatte die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  einen Wert von 0,143, war also als nicht signifikant einzustufen. Bei Berechnung der Signifikanz der Herpesvirus-NT-Ergebnisse zwischen adulten und juvenilen Tieren hatte die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  einen Wert von 0,035, somit war hier der Einfluß des Alters als signifikant zu bezeichnen.

Tabelle 31: Herpesvirus-NT-Ergebnisse in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Schildkröten

<b>Untersuchte Schildkröten</b>		
<b>Ergebnis NT</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>
männlich negativ	83,8	114
männlich positiv	16,2	22
weiblich negativ	89,6	146
weiblich positiv	10,4	17
juvenil negativ	100,0	30
juvenil positiv	0	0
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>

#### **4.4 Korrelationen zwischen den Ergebnissen der klinischen, bakteriologischen, virologischen und serologischen Untersuchungen**

Neben der durchgeführten und bereits beschriebenen Analyse der Einzelergebnisse wurde eine Untersuchung der verschiedenen Einzelresultate und deren Korrelation untereinander, mit Rhinitis- und/oder

Stomatitissymptomen, bzw. dem Tod der untersuchten Schildkröten, durchgeführt.

Dabei konnten nur jene Symptome protokolliert werden, welche während der Probenentnahme und der in diesem Rahmen durchgeführten klinischen Allgemeinuntersuchung auffällig wurden.

Auch war ein vollständiges Protokollieren der Todesfälle innerhalb der Gruppe der untersuchten Tiere nur bedingt möglich. Aufgrund der äußeren Umstände konnten nur Aufzeichnungen über die 1996 untersuchten und bis einschließlich September 1997 gestorbenen Tiere gemacht werden. Die im Jahr 1997 getesteten und während des folgenden Jahres gestorbenen Tiere wurden in Frankreich nur unvollständig protokolliert. So erfolgte nur eine statistische Auswertung der Todesfälle für die oben erwähnten Schildkröten von 1996.

Die prozentualen Angaben innerhalb der Tabellen und Abbildungen wurden auf eine Dezimalstelle hinter dem Komma gerundet.

#### **4.4.1 Gesundheitszustand und Sterblichkeitsrate der untersuchten Schildkröten**

Von den zur Untersuchung gelangten 329 Schildkröten zeigten 10,9 % Rhinitis- und/oder Stomatitissymptome, 89,1 % der untersuchten Schildkröten waren äußerlich scheinbar gesunde Tiere.



141 (78,3 %) der insgesamt 180 im Jahr 1996 untersuchten Schildkröten lebten bis einschließlich September 1997 noch, 39 (21,7 %) der getesteten Tiere waren bis zu diesem Zeitpunkt verstorben.

#### 4.4.2 Korrelation der Ergebnisse der Mykoplasmen-PCR und der klinischen Untersuchung

Nachfolgend wurde die mögliche Korrelation zwischen dem Gesundheitszustand und dem Ergebnis der Mykoplasmen-PCR bei 329 Tieren untersucht (Tabelle 32). Von 8 PCR-positiven Schildkröten zeigten 4 Tiere Rhinitis-und/oder Stomatitissymptome, die anderen 4 Schildkröten zeigten keine Anzeichen einer Rhinitis und/oder Stomatitis. Von 321 Schildkröten mit negativem PCR-Ergebnis zeigten 32 Symptome von Rhinitis und/oder Stomatitis, 289 Tiere waren frei von solchen Symptomen.

Tabelle 32: Ergebnis der Mykoplasmen-PCR in Korrelation zu dem Gesundheitszustand der Schildkröten

Untersuchte Schildkröten			
Ergebnis PCR	Rhinitis oder Stomatitis	ohne Symptome	Summe
PCR positiv	4	4	8
PCR negativ	32	289	321
<b>gesamt</b>	<b>36</b>	<b>293</b>	<b>329</b>

Zum Vergleich der prozentualen Häufigkeiten wurde zur besseren Darstellung die Berechnung von Chi-Quadrat mit der bei CAVALLI-SFORZA (1964) angeführten Methode und der dort aufgeführten Tabelle 20.1 der Chi-Quadrat-Sicherheitspunkte (CAVALLI-SFORZA; Seite 52) verwendet. Nach Berechnung

von Chi-Quadrat nach dieser Methode ergab sich ein Wert von 9,06. Diese Zahl war ein Chi-Quadrat-Wert mit einem Freiheitsgrad, da zwei Prozentzahlen miteinander verglichen wurden. Aus der Tabelle der Chi-Quadrat-Sicherheitspunkte bei CAVALLI-SFORZA (1964) ergab sich eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 1 % bei einem Wert von 6,635. Da der hier errechnete Chi-Quadrat-Wert mit 9,06 sogar darüber lag, konnte der Unterschied als hoch signifikant bezeichnet werden. Es bestand ein starker Zusammenhang zwischen dem Gesundheitszustand und dem Ergebnis der Mykoplasmen-PCR.

Anschließend erfolgte die Untersuchung auf eine mögliche Korrelation der Ergebnisse der Mykoplasmen-PCR mit der bis September 1997 vermerkten Sterberate 1996 untersuchter Schildkröten (Tabelle 33). Von 8 PCR-positiven Schildkröten waren 4 Tiere im September 1997 noch am Leben und 4 Schildkröten bereits gestorben. Von 172 untersuchten Tieren mit negativem PCR-Ergebnis waren 137 Schildkröten im September 1997 am Leben und 35 bereits gestorben.

Tabelle 33: Ergebnis der Mykoplasmen-PCR in Korrelation zur Sterblichkeit der 1996 untersuchten Schildkröten (Status bis September 1997)

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>PCR Ergebnis</b>	<b>tot</b>	<b>lebend</b>	<b>Summe</b>
PCR positiv	4	4	8
PCR negativ	35	137	172
<b>gesamt</b>	<b>39</b>	<b>141</b>	<b>180</b>

Zum Vergleich der prozentualen Häufigkeiten wurde zur Verdeutlichung der Ergebnisse hier wiederum die Berechnung von Chi-Quadrat mit der bei CAVALLI-SFORZA (1964) angeführten Methode und Tabelle 20.1 der Chi-Quadrat-Sicherheitspunkte (CAVALLI-SFORZA; Seite 52) verwendet. Nach Berechnung von Chi-Quadrat ergab sich ein Wert von 2,41. Da zwei Prozentzahlen miteinander verglichen wurden, war diese Zahl wiederum ein Chi-Quadrat-Wert mit einem Freiheitsgrad. Aus der Tabelle der Chi-Quadrat-Sicherheitspunkte bei CAVALLI-SFORZA (1964) ergab sich eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 % bei einem Wert von 3,841. Da der hier errechnete Chi-Quadrat-Wert mit 2,41 darunter lag, konnte der Unterschied als nicht signifikant bezeichnet werden. Es bestand somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Mykoplasmen-PCR und der Tatsache, ob die Tiere im September 1997 bereits gestorben waren oder nicht.

#### **4.4.3 Korrelation der Ergebnisse des Mykoplasmen-ELISA und der klinischen Untersuchung**

Zunächst wurde die Korrelation zwischen dem Gesundheitszustand und dem Ergebnis des Mykoplasmen-ELISA untersucht (Tabelle 34). Von 293 symptomfreien Schildkröten hatten 165 (56,3 %) ein negatives, 78 (26,6 %) ein positives und 50 (17,1 %) ein fragliches Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis. Von 36 Schildkröten mit Rhinitis-und/oder Stomatitissymptomen hatten 8 (22,2 %) ein negatives, 24 (66,7 %) ein positives und 4 (11,1 %) ein fragliches Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis. Es ergab sich ein Chi-Quadrat-Wert nach Pearson von 24,36. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von

$< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen. Es bestand ein Zusammenhang zwischen dem Gesundheitszustand und dem Ergebnis des Mykoplasmen-ELISA. So war bei den symptomfreien ein negatives Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis, bei den erkrankten Tieren ein positives Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis sehr wahrscheinlich.

**Tabelle 34:** Ergebnis des Mykoplasmen-ELISA in Korrelation zu dem Gesundheitszustand der Schildkröten

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis ELISA</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
symptomfrei negativ	56,3	165	50,2
symptomfrei positiv	26,6	78	23,7
symptomfrei fraglich	17,1	50	15,2
Rhinitis / Stomatitis negativ	22,2	8	2,4
Rhinitis / Stomatitis positiv	66,7	24	7,3
Rhinitis / Stomatitis fraglich	11,1	4	1,2
<b>Gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100</b>

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Ergebnisse des Mykoplasmen-ELISA mit der Sterberate der 1996 untersuchten Tiere auf eine mögliche Korrelation (Tabelle 35).

95 Tiere zeigten ein negatives Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis, davon waren 81 (85,3 %) Schildkröten im September 1997 am Leben und 14 (14,7 %) Tiere im September 1997 gestorben. Von 63 im Mykoplasmen-ELISA positiven Schildkröten waren zu diesem Zeitpunkt noch 43 (68,3 %) Tiere am Leben, 20 (31,7 %) Tiere waren bereits gestorben. In der Gruppe der fraglichen

Mykoplasmen-ELISA-Ergebnisse waren zu diesem Zeitpunkt noch 17 (77,3 %) Tiere am Leben, 5 (22,7 %) Tiere waren bereits verstorben. Der Chi-Quadrat-Wert nach Pearson betrug hier 6,47. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von 0,039, war also als signifikant einzustufen. Es bestand ein positiver Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen. Der Kontingenzkoeffizient war ebenfalls signifikant und wies mit 0,186 einen positiven Zusammenhang auf. So war die Wahrscheinlichkeit, daß die Tiere bis zum September 1997 gestorben waren, bei Mykoplasmen-ELISA-positiven Schildkröten wesentlich größer als bei Tieren mit negativem Mykoplasmen-ELISA-Testergebnis.

Tabelle 35: Ergebnis des Mykoplasmen-ELISA in Korrelation zur Sterblichkeit der 1996 untersuchten Schildkröten (Status bis September 1997)

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis ELISA</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
negativ lebend	85,3	81	45,0
negativ tot	14,7	14	7,8
positiv lebend	68,3	43	23,9
positiv tot	31,7	20	11,1
fraglich lebend	77,3	17	9,4
fraglich tot	22,7	5	2,8
<b>Gesamt</b>	<b>-</b>	<b>180</b>	<b>100,0</b>

#### **4.4.4 Korrelation der Ergebnisse der Untersuchung auf Herpesvirus und der klinischen Untersuchung**

Bei der Auswertung der möglichen Korrelation zwischen Gesundheitszustand und der Untersuchung der Tupferproben auf Herpesvirus mittels Zellkultur wurde auf eine statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse verzichtet, da lediglich die Tupferproben eines einzigen Tieres positiv waren.

#### **4.4.5 Korrelation der Ergebnisse des Herpesvirus-Neutralisationstests und der klinischen Untersuchung**

Nachfolgend wurde die mögliche Korrelation zwischen Gesundheitszustand und dem Ergebnis des Herpesvirus-Neutralisationstests untersucht (Tabelle 36). Von 293 symptomfreien Schildkröten hatten 262 (89,4 %) ein negatives und 31 (10,6 %) ein positives NT-Ergebnis. Von 36 Schildkröten mit Rhinitis-und/oder Stomatitissymptomen hatten 28 (77,8 %) ein negatives und 8 (22,2 %) ein positives NT-Ergebnis. Es ergab sich ein Chi-Quadrat-Wert nach Pearson von 4,16. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von 0,041, war also als signifikant einzustufen. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesundheitszustand und dem Ergebnis des Herpesvirus-NT.

Tabelle 36: Ergebnis des Herpesvirus-NT in Korrelation zu dem Gesundheitszustand der Schildkröten

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis NT</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
symptomfrei negativ	89,4	262	79,7
symptomfrei positiv	10,6	31	9,4
Rhinitis / Stomatitis negativ	77,8	28	8,5
Rhinitis / Stomatitis positiv	22,2	8	2,4
<b>gesamt</b>	-	<b>329</b>	<b>100,0</b>

Anschließend erfolgte die mögliche Korrelation der Ergebnisse des Herpesvirus-NT mit der Sterberate 1996 untersuchter Tiere (Tabelle 37). 142 Tiere zeigten ein negatives Herpesvirus-NT-Ergebnis, davon waren 110 (77,5 %) Schildkröten im September 1997 am Leben und 32 (22,5 %) Tiere im September 1997 gestorben. Von 38 im NT positiven Schildkröten waren zu diesem Zeitpunkt noch 31 (81,6 %) Tiere am Leben, 7 (18,4 %) Tiere waren bereits gestorben. Der Chi-Quadrat-Wert nach Pearson betrug hier 0,30. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von 0,585, war also als nicht signifikant einzustufen. Es bestand kein positiver Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen.

Tabelle 37: Ergebnis des Herpesvirus-NT in Korrelation zur Sterblichkeit der 1996 untersuchten Schildkröten (Status bis September 1997)

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis NT</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
negativ lebend	77,5	110	61,1
negativ tot	22,5	32	17,8
positiv lebend	81,6	31	17,2
positiv tot	18,4	7	3,9
<b>Gesamt</b>	-	<b>180</b>	<b>100,0</b>

#### 4.4.6 Korrelation der Ergebnisse des Mykoplasmen-ELISA und der Mykoplasmen-PCR

Zunächst wurden die Ergebnisse des Mykoplasmen-ELISA und der Mykoplasmen-PCR auf eine mögliche Korrelation geprüft (Tabelle 38). Von 173 Mykoplasmen-ELISA-negativen Schildkröten hatten alle Tiere ebenso ein negatives Mykoplasmen-PCR-Ergebnis. Von 102 Schildkröten mit positivem Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis hatten 94 (92,2 %) ein negatives und 8 (7,8 %) ein positives Mykoplasmen-PCR-Ergebnis. Von 54 im Mykoplasmen-ELISA fraglichen Tieren hatten 54 (100 %) ein negatives und 0 Schildkröten ein positives Mykoplasmen-PCR-Ergebnis. Es ergab sich ein Kontingenzkoeffizient von 0,229. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen. Es bestand ein stark positiver Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen. Alle Mykoplasmen-ELISA-negativen Tiere wiesen auch ein negatives Mykoplasmen-PCR-Ergebnis



auf, alle Mykoplasmen-PCR-positiven Tiere hingegen waren ebenfalls Mykoplasmen-ELISA-positiv.

Tabelle 38: Ergebnis der Mykoplasmen-PCR in Korrelation zu den Ergebnissen des Mykoplasmen-ELISA

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis ELISA-PCR</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
ELISA negativ-PCR negativ	100,0	173	52,6
ELISA negativ-PCR positiv	0	0	0
ELISA positiv-PCR negativ	92,2	94	28,6
ELISA positiv-PCR positiv	7,8	8	2,4
ELISA fraglich-PCR negativ	100,0	54	16,4
ELISA fraglich-PCR positiv	0	0	0
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

#### **4.4.7 Korrelation der Ergebnisse der Mykoplasmen-PCR und des Herpesvirus-Neutralisationstest**

Weiterhin wurden die Ergebnisse der Mykoplasmen-PCR und des Herpesvirus-NT auf eine mögliche Korrelation geprüft (Tabelle 39). Von 321 Mykoplasmen-PCR-negativen Schildkröten hatten 286 (89,1 %) ein negatives und 35 (10,9 %) ein positives NT-Ergebnis. Von 8 Schildkröten mit positivem Mykoplasmen-PCR-Ergebnis hatten 4 (50 %) ein negatives und 4 (50 %) ein positives Herpesvirus-NT-Ergebnis. Es ergab sich ein Kontingenzkoeffizient von 0,183. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte hier einen Wert von 0,001, war also als hoch signifikant einzustufen. Es bestand ein starker Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Ein Großteil der Mykoplasmen-PCR-negativen Tiere wies auch ein negatives Herpesvirus-NT-Ergebnis auf, währenddessen zumindest

die Hälfte alle Mykoplasmen-PCR-positiven Tiere ebenfalls Herpesvirus-NT-positiv war.

Tabelle 39: Ergebnis des Herpesvirus-NT in Korrelation zu den Ergebnissen der Mykoplasmen-PCR

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis PCR-NT</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
PCR negativ-NT negativ	89,1	286	86,9
PCR negativ-NT positiv	10,9	35	10,7
PCR positiv-NT negativ	50,0	4	1,2
PCR positiv-NT positiv	50,0	4	1,2
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

#### **4.4.8 Korrelation der Ergebnisse des Herpesvirus-Neutralisationstests und des Mykoplasmen-ELISA**

Nachfolgend wurden die Ergebnisse des Herpesvirus-NT und des Mykoplasmen-ELISA auf eine mögliche Korrelation geprüft (Tabelle 40). Von 290 NT-negativen Schildkröten hatten 168 (57,9 %) ein negatives, 70 (24,2 %) ein positives und 52 (17,9 %) Tiere ein fragliches Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis. Von 39 Schildkröten mit positivem NT-Ergebnis hatten 5 (12,8 %) ein negatives, 32 (82,1 %) ein positives und 2 (5,1 %) der Tiere ein fragliches Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis. Es ergab sich ein Kontingenzkoeffizient von 0,375 und ein Phi-Wert von 0,405. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p hatte hier einen Wert von  $< 0,0005$ , war also als hoch signifikant einzustufen. Es bestand ein sehr starker Zusammenhang zwischen den Variablen. Ein Großteil der Herpesvirus-NT-negativen Tiere wiesen auch ein negatives Mykoplasmen-

ELISA-Ergebnis auf, der Hauptanteil aller Herpesvirus-NT-positiven Tiere hingegen war ebenfalls Mykoplasmen-ELISA-positiv.

Tabelle 40: Ergebnis des Mykoplasmen-ELISA in Korrelation zu den Ergebnissen des Herpesvirus-NT

<b>Untersuchte Schildkröten</b>			
<b>Ergebnis NT-ELISA</b>	<b>% innerhalb der Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>% der Gesamtzahl</b>
NT negativ-ELISA negativ	57,9	168	51,1
NT negativ-ELISA positiv	24,2	70	21,3
NT negativ-ELISA fraglich	17,9	52	15,8
NT positiv-ELISA negativ	12,8	5	1,5
NT positiv-ELISA positiv	82,1	32	9,7
NT positiv-ELISA fraglich	5,1	2	0,6
<b>gesamt</b>	<b>-</b>	<b>329</b>	<b>100,0</b>

#### **4.4.9 Korrelation der Ergebnisse der Untersuchung auf Herpesvirus und anderer durchgeführter Untersuchungen**

Bei der Auswertung der möglichen Korrelation zwischen der Untersuchung der Tupferproben auf Herpesvirus mittels Zellkultur und den Ergebnissen der anderen durchgeführten Untersuchungen wurde auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet, da nur die Tupferproben eines einzigen Tieres positiv waren.

## 5 Diskussion

### 5.1 Mykoplasmen bei Landschildkröten

Mykoplasmeninfektionen der Landschildkröten wurden bisher fast ausschließlich bei in den USA oder Mexiko untersuchten Tieren nachgewiesen, wobei es sich meist um Gopher- oder Wüstenschildkröten handelte (JACOBSON und GASKIN, 1990; JACOBSON et al., 1991b; BROWN et al., 1992; SCHUMACHER et al., 1992; SCHUMACHER et al., 1993; BROWN et al., 1994; JACOBSON et al., 1995; LEDERLE et al., 1997; SCHUMACHER et al., 1997; HOMER et al., 1998; BROWN et al., 1999b; BROWN et al., 1999c; SCHUMACHER et al., 1999; MCLAUGHLIN et al., 2000; BROWN et al., 2001c). Lediglich HILL (1985) isolierte *Mycoplasma testudinis* aus der Kloake einer klinisch gesunden *Testudo graeca* in England.

Berichte über Mykoplasmeninfektionen in Zusammenhang mit einer klinischen Erkrankung lagen bis zu Beginn dieser Arbeit für Landschildkröten in Europa oder Afrika nicht vor. Daher war eine der wesentlichen Fragen, die es im Zuge der vorliegenden Untersuchungen zu beantworten galt, inwieweit in Frankreich und Marokko lebende Schildkröten ebenfalls mit Mykoplasmen infiziert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde Mykoplasmen-DNA in Nasenspülproben bei in Gefangenschaft in Frankreich gehaltenen *Testudo graeca* (TGG und TGI) nachgewiesen. Antikörper gegen Mykoplasmen wurden sowohl bei freilebenden mediterranen Landschildkröten wie THH in Frankreich und TGG in Marokko als auch bei in Gefangenschaft gehaltenen Griechischen und Maurischen

Landschildkröten in Frankreich gefunden. Aufgrund der erlangten Ergebnisse kann der Nachweis einer Infektion mit Mykoplasmen auch bei Landschildkröten in Frankreich und Marokko als gesichert angesehen werden.

### 5.1.1 Kultivierung und PCR der Mykoplasmen

Die in der vorliegenden Arbeit mittels Nasenspülung isolierten Mykoplasmen der mediterranen Landschildkröten wiesen ein spiegeleiartiges Aussehen aufgrund des biphasischen Wachstums auf. Hierbei konnten im Zentrum der Kolonien eine opake, granulierte Zone mit kegelförmigem Wachstum in die Tiefe des Mediums und eine flachere, durchsichtige Zone an der Peripherie der Kolonien unterschieden werden. Dieses Aussehen deckt sich mit den von HILL (1985) aus der Kloake einer *Testudo graeca* in England isolierten *Mycoplasma testudinis*. *Mycoplasma agassizii* Stamm PS6, welcher von BROWN et al. (2001c) aus der Nasenspülprobe einer an URTD erkrankten Wüstenschildkröte isoliert worden war, wies zunächst maulbeerartige Kolonieformen auf. Nach einigen Passagen nahmen diese allerdings ebenfalls ein spiegeleiartiges Aussehen an.

Der Nachweis von Mykoplasmen mittels Kultivierung und PCR (Zahl der positiven Proben stimmten bei beiden Untersuchungen überein) in der Nasenspülprobe gelang in der vorliegenden Arbeit ausschließlich bei in Gefangenschaft gehaltenen Maurischen Landschildkröten (TGG und TGI) in Frankreich. Bei keinem der getesteten freilebenden Tiere konnten Mykoplasmen mittels Kultivierung oder PCR nachgewiesen werden. Keine untersuchte THH, ob freilebend oder in Gefangenschaft gehalten, zeigte ein

positives Ergebnis bei der Testung auf Mykoplasmen. Inwieweit das Geschlecht und das Alter der Tiere eine Rolle spielte, kann nur schwer eingeschätzt werden. So zeigten nur adulte, davon 7 weibliche und nur ein männliches Tier, positive Mykoplasmen-Kultur- und PCR-Ergebnisse. Keine der getesteten juvenilen Schildkröten erzielte ein positives Ergebnis in Mykoplasmen-PCR oder Kultur. Da die Maurischen Landschildkröten nach Alter und Geschlechtern getrennt im Schildkrötendorf untergebracht waren, konnten weitere neben Geschlecht und Alter relevante Faktoren in dieser Untersuchung nicht sicher abgegrenzt werden. In der Literatur finden sich bisher keine statistischen Vergleichsuntersuchungen der Relevanz von Subspezies, Geschlecht und Alter im Bezug auf Kultivierung oder PCR der Mykoplasmen bei Landschildkröten. Eine Übertragung durch infizierte Bruteier, wie es bei der Mykoplasmosenose der Vögel bekannt ist (SELBITZ, 2002), konnte bisher bei Schildkröten nicht belegt werden. In von MCLAUGHLIN (1997) unternommenen Transmissionsstudien bei Schlüpflingen seropositiver Gopherschildkröten konnte keine vertikale Übertragung von Mykoplasmen nachgewiesen werden. In einer weiteren Studie beschrieb MCLAUGHLIN (1997) allerdings, daß Schlüpflinge in der Regel innerhalb kürzester Zeit nach horizontaler Übertragung von Mykoplasmen klinische Symptome der URTD zeigten und positive Kultur-Resultate aufwiesen. Da die in der hier vorliegenden Arbeit getesteten Jungtiere keinerlei Anzeichen einer klinischen Erkrankung aufzeigten, überrascht daher das negative Ergebnis der Untersuchungen auf Mykoplasmen keineswegs.

In der hier vorliegenden Arbeit erwiesen sich alle Mykoplasmen-Kultur-positiven Proben ebenfalls in der Mykoplasmen-PCR als positiv. Dies entspricht den

Ergebnissen der von BROWN et al. (1999c) vorgenommenen experimentellen Transmissionsstudie, in welcher die Anzahl positiver Ergebnisse der Kultivierung von Mykoplasmen in etwa jener der PCR gleichzusetzen ist.

Bei Mykoplasmen-Anzucht und PCR fiel die insgesamt relativ geringe Anzahl positiver Ergebnisse (8 Tiere bzw. 2,4 %) im Vergleich zur Untersuchung auf Mykoplasmen-Antikörper mittels ELISA (102 Tiere, bzw. 31 %) auf. BROWN et al. (1999c) berichteten von ähnlichen Ergebnissen im Vergleich dieser Verfahren bei auf *Mycoplasma agassizii* getesteten Gopherschildkröten. Dort verlief die Untersuchung auf Mykoplasmen mittels ELISA über einen längeren Zeitraum wesentlich häufiger positiv, als das bei Mykoplasmen-Anzucht oder PCR der Fall war. Interessant ist der zeitliche Verlauf nach experimenteller Infektion in der von BROWN et al. (1999c) durchgeführten Studie. So konnten nach 4 Wochen in der Kultur aller infizierter Schildkröten Mykoplasmen nachgewiesen werden, der Mykoplasmen-ELISA war allerdings zu diesem Zeitpunkt bei der Hälfte der Tiere negativ. Ab der 8. Woche post infectionem allerdings zeigten alle infizierten Tiere ein positives Mykoplasmen-ELISA-Ergebnis, während die Anzahl in der Kultur positiver Tiere erheblich nachließ. Somit hing also die Aussagekraft der unterschiedlichen Untersuchungen entscheidend vom Infektions,- bzw. Untersuchungszeitpunkt nach Infektion der Tiere ab.

Der Einsatz genusspezifischer Primer bei der Mykoplasmen-PCR und die anschließende Restriktionsenzymanalyse ermöglichte in der vorliegenden Arbeit eine Unterscheidung der gefundenen Mykoplasmen in unterschiedliche

Spezies. Eine Differenzierung der nachgewiesenen Mykoplasmen scheint um so wichtiger, da nach Berichten von BROWN et al. (1999c) Unterschiede innerhalb der Spezies von *Mycoplasma agassizii* existieren, von denen einige selbst in hohen Dosierungen nicht im Stande sind, eine klinische Erkrankung bei infizierten Tieren auszulösen. JACOBSON et al. (2003 - in press) sehen die Pathogenität von *Mycoplasma agassizii* Stamm PS6 und Stamm 723 zumindest bei den Gopherschildkröten und Wüstenschildkröten mittlerweile als gesichert an. Weitere Isolate wurden allerdings bisher noch nicht auf ihre Pathogenität überprüft.

Die im Zuge der vorliegenden Studie mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse charakterisierten *Mycoplasma agassizii*-Isolate stimmten zum Teil nicht mit dem bei Landschildkröten in Amerika isolierten Stamm PS6 überein. Erst bei einer nachfolgend durchgeführten Sequenzierung der PCR-Produkte zweier Mykoplasma-Isolate konnte eine eindeutige Zuordnung der Isolate zur Spezies *Mycoplasma agassizii* vorgenommen werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde bei 4 TGG und 4 TGI *Mycoplasma agassizii* in der Nasenspülprobe nachgewiesen. Bei drei Isolaten aus TGI lag eine Punktmutation des 16S-rRNA-Gens vor. Bisher wurden dieses als „*Mycoplasma agassizii* K120“ bezeichnete Isolat bei keiner anderen Landschildkröte nachgewiesen, allerdings kann davon ausgegangen werden, daß diese Punktmutation keinen Einfluß auf die Funktion des 16S-rRNA-Gens besaß. Dafür spricht auch die Tatsache, daß sich dieser Stamm mittels immunologischer und metabolischer Untersuchungen nicht von *Mycoplasma agassizii* Stamm PS6 unterscheiden ließ.



### 5.1.2 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Mykoplasmen

Bei den Untersuchungen auf Mykoplasmen-Antikörper zeigten 21,8 % freilebender Schildkröten ein positives Ergebnis, bei in Gefangenschaft gehaltenen Tieren waren es 37,2 %. Auch die errechneten Titer-Mittelwerte lagen bei den freilebenden Tieren mit einer ELISA-Ratio von 3,30 wesentlich niedriger als bei den in Gefangenschaft gehaltenen Tieren (bis 7,28). Mittels Mykoplasmen-ELISA konnten bei *Testudo graeca* wesentlich häufiger Antikörper nachgewiesen werden als bei *Testudo hermanni*. Dies traf sowohl bei den freilebenden als auch wesentlich ausgeprägter bei in Gefangenschaft gehaltenen Tieren zu. Ebenso erzielten in menschlicher Obhut gehaltene TGG und TGI deutlich höhere Mittelwerte im Mykoplasmen-ELISA (bis 7,28 bzw. bis 6,10) als THH (bis 3,90). Vergleichende Untersuchungen der Mykoplasmen-ELISA-Ergebnisse unterschiedlicher Schildkrötensubspezies oder Lokalisationen lagen in der Literatur bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vor. Allerdings könnten die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen einen Hinweis auf die unterschiedliche Empfänglichkeit der verschiedenen Spezies und Subspezies geben.

Bei der Ermittlung der Mittelwerte des Mykoplasmen-ELISA konnten keine signifikant geschlechtsabhängige, wohl aber altersabhängige Unterschiede festgestellt werden. Zwar zeigten die juvenilen Tiere einen deutlich niedrigeren Mittelwert (1,69) im Mykoplasmen-ELISA als die adulten Schildkröten (3,39 bzw. 3,35), doch handelte es sich bei den untersuchten juvenilen Tieren ausschließlich um THH. Daher sind diese scheinbaren altersbedingten

Unterschiede eventuell auch auf die Spezies- und Subspezieszugehörigkeit zurückzuführen. Im Schildkrötendorf in Gonfaron erfolgte eine geschlechts- und altersbedingte getrennte Unterbringung der untersuchten Landschildkröten. Somit konnten zusätzliche die Ansteckung mit Mykoplasmen beeinflussende Faktoren nicht sicher ausgeschlossen werden. LEDERLE et al. (1997) stellten nur minimale geschlechtsabhängige Unterschiede bei freilebenden Wüstenschildkröten in Nevada fest. Dies galt sowohl für den Prozentsatz positiver Tiere als auch für die errechneten Maximalwerte der ELISA-Ratio in dieser sechsjährigen Untersuchung. SCHUMACHER et al. (1997) verglichen ebenfalls positive Ergebnisse des Mykoplasmen-ELISA bei *Gopherus agassizii* in Nevada. Hierbei zeigten 62 % der männlichen, 49 % der weiblichen Tiere und 25 % der juvenilen Tiere ein positives Testergebnis. In einer weiteren Studie an freilebenden Wüstenschildkröten in Kalifornien konnten BROWN et al. (1999b) keine geschlechtsabhängigen Unterschiede bei den mittels Mykoplasmen-ELISA untersuchten Tieren feststellen.

### **5.1.3 Mykoplasmen und klinische Erkrankungen**

Die Einschätzung des Gesundheitszustandes allein anhand der äußerlich augenfälligen Symptome scheint problematisch. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur bei 36 Tieren (10,9 % der untersuchten Schildkröten) Anzeichen einer Rhinitis festgestellt werden, bei drei Tieren wurde dabei zusätzlich eine Stomatitis diagnostiziert. Bei den meisten der klinisch auffälligen Schildkröten konnte als einziges Anzeichen einer Erkrankung ein geringgradiger Nasenausfluß beobachtet werden.

Etliche Autoren berichteten im Laufe der Jahre vom Auftreten multipler Symptome der URTD bei Wüsten- und Gopherschildkröten in Amerika. Klinische Anzeichen einer Infektion mit Mykoplasmen bei den betroffenen Landschildkröten in Amerika wurden vor allem mit serösem, mukösem oder purulentem Nasenausfluß und Augenausfluß, Konjunktivitis und Lidödem angegeben (JACOBSON et al., 1991b; LEDERLE et al., 1997; MCLAUGHLIN, 1997; SCHUMACHER et al., 1997; BROWN et al., 1999b; MCLAUGHLIN et al., 2000; JACOBSON et al., 2003 - in press).

Klinisch erkrankte Landschildkröten der vorliegenden Untersuchung zeigten ein bläschenbildendes, klares Nasensekret von zum Teil seromuköser Konsistenz. Eine zusätzliche Stomatitis konnte nur bei drei Tieren diagnostiziert werden. Eine nekrotisierende Stomatitis fand bereits bei ROSSKOPF (1990) in Zusammenhang mit besonders starker URTD der Wüstenschildkröte in Amerika Erwähnung. In der vorliegenden Studie konnten einige betroffene Tiere aufgrund der durch die Vorderbeine unterstützten erschwerten Atmung und dem lautstarken Stridor in einer Gruppe von Schildkröten erkannt werden. Besonders schwer erkrankte Schildkröten wiesen zusätzlich eine hochgradige Kachexie und Exsikkose auf. Bei keiner der in Frankreich oder Marokko untersuchten mediterranen Schildkröten konnten Konjunktivitis oder Lidödem, wie im Zusammenhang mit der Mykoplasmeninfektion der Gopher- und Wüstenschildkröten in Amerika auftretend, beobachtet werden. Allerdings soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, daß diese Symptome bei in der Praxis in Deutschland und Frankreich vorgestellten, in Gefangenschaft gehaltenen

*Testudo graeca* mit starken klinischen Anzeichen einer URTD regelmäßig zu beobachten sind.

Aufgrund der nicht immer deutlich erkennbaren Symptome kann mit Hilfe der klinischen Untersuchung eine Infektion mit Mykoplasmen nur schwer diagnostiziert werden. In der vorliegenden Untersuchung wiesen etliche Schildkröten Antikörper gegen Mykoplasmen im ELISA auf, ohne klinische Anzeichen einer Erkrankung zu zeigen. Diese Erfahrung deckt sich mit den von LEDERLE et al. (1997) bei Wüstenschildkröten in Nevada gewonnenen Erkenntnissen. Auch JACOBSON et al. (1991b ; 1995) werteten die klinischen Symptome bei der URTD von Gopher- und Wüstenschildkröten nur als unzureichendes Kriterium zur Beurteilung einer bestehenden Mykoplasmeninfektion. MCLAUGHLIN et al. (2000) gelangten zu ähnlichen Erkenntnissen bei der Untersuchung von Gopherschildkröten in Florida. Dies wirft einmal mehr die Frage nach möglichen inapparenten Infektionsträger auf.

Vor allem bei rund um Marrakesch lebenden TGG dieser Studie konnten bei der klinischen Untersuchung zunächst keine pathologischen Veränderungen diagnostiziert werden, bei Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung zeigten sich jedoch häufig eingetrocknete Sekretreste in der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit. Vermutlich gelangte das zähflüssige bis krümelige eingetrocknete Sekret nicht über die engen Nasenöffnungen nach außen, sondern verblieb vielmehr in den großräumigen Nasenhöhlen der Tiere.

Beim morgendlichen Kontrollgang durch das Schildkrötendorf war auffallend, daß an manchen Tagen die mit den Vorderbeinen verstärkte Atmung und der

Stridor in der Gruppe erkrankter Tiere vermehrt erkennbar war. An anderen Tagen konnten die Symptome nur in wesentlich unbedeutenderem Maße und bei einer geringeren Anzahl von Schildkröten beobachtet werden. Diese tägliche Varianz der auftretenden Krankheitssymptome deckt sich mit den von BROWN et al. (1999c) bei Gopher- und Wüstenschildkröten mit URTD gemachten Beobachtungen. Die gegebenenfalls täglich in ihrem Auftreten wechselnden Krankheitssymptome liefern ein weiteres Argument dafür, daß klinische Anzeichen häufig nicht zur Beurteilung des Gesundheitszustandes einer Schildkröte ausreichen. Besonders bei einer einmalig durchgeführten klinischen Untersuchung ist es durchaus möglich, eine bereits an URTD erkrankte Schildkröte zu verkennen und als symptomlos einzustufen.

## **5.2 Herpesviren**

Herpesvirusinfektionen wurden bisher ausschließlich bei in Gefangenschaft gehaltenen Landschildkröten nachgewiesen, die meist Symptome einer Rhinitis und Stomatitis zeigten (HARPER et al., 1982; JACOBSON et al., 1985; COOPER et al., 1988; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; LANGE et al., 1989; MÜLLER et al., 1990; WITTE, 1992; BIERMANN und BLAHAK, 1993; KABISCH und FROST, 1994; BLAHAK und BIERMANN, 1995; PETTAN-BREWER et al., 1996; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG et al., 1997b; POSTHAUS et al., 1997; DRURY et al., 1998; MURO et al., 1998; DRURY et al., 1999a; KÜBBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 1999b; MARSCHANG, 1999a; UNE et al., 1999; SCHMIDT, 2000; MARSCHANG et al., 2001b; MARTÍNEZ SILVESTRE et al.,

2001; MCARTHUR, 2001; HERVAS et al., 2002). Bisher konnte von keinem der genannten zahlreichen Autoren die Henle-Kochschen Postulate vollständig erfüllt werden.

Eine weitere zentrale Frage, die es im Zuge dieser Arbeit zu beantworten galt, war ob und in welchem Maße freilebende Schildkröten mit Herpesviren infiziert sind. Ferner hatte keine der zitierten Untersuchungen an Schildkröten in Frankreich stattgefunden. Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die Prävalenz von Herpesviren bei in Frankreich gehaltenen Landschildkröten zu untersuchen.

Antikörper gegen Herpesviren wurden mittels Neutralisationstest weder bei freilebenden *Testudo hermanni hermanni* in Frankreich noch bei freilebenden *Testudo graeca graeca* in Marokko gefunden. In Frankreich in Gefangenschaft gehaltene TGG und TGI wiesen dagegen Antikörper gegen Herpesviren auf. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann nun auch in Frankreich der Nachweis von Infektionen mit Herpesviren bei in Gefangenschaft gehaltenen Landschildkröten als gesichert angesehen werden.

### **5.2.1 Herpesvirusisolate aus Tupferproben**

Bei den auf Herpesviren untersuchten Tupferproben konnte nur bei einer weiblichen *Testudo graeca ibera* mit klinischen Anzeichen einer Stomatitis und Rhinitis ein positives Ergebnis festgestellt werden. Dieses Tier zeigte sowohl im Maulhöhlen- als auch im Kloakentupfer einen deutlichen zytopathischen Effekt, welcher in einer weiteren Untersuchung durch Zugabe von Chloroform

vollständig ausblieb. Sowohl in der Maulhöhlen- als auch in der Kloakentupferprobe erfolgte nach Zusatz von IUDR eine Reduktion der KID<sub>50</sub> je ml um eine Zehner-Log-Stufe. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung gefundene Partikel wurden aufgrund ihrer Größe und Morphologie den Herpesviren zugeordnet. Bei keinem der anderen untersuchten Tiere konnte aus Tupferproben eine Infektion mit Herpesviren nachgewiesen werden. In diversen Untersuchungen anderer Autoren gelang die Isolation von Herpesviren aus Rachentupfern lebender Schildkröten (FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 1999b; BLAHAK, 2000b; SCHMIDT, 2000; MARSCHANG et al., 2001b). Versuche einer Herpesvirusisolierung aus Kloaken- oder Konjunktivaltupfern mißlangen bisher. Erstmalig gelang im Zuge der vorliegenden Arbeit die Isolation von Herpesviren aus einem Kloakaltupfer. Dabei gelang die Virusisolierung aus einer akut an Stomatitis und Rhinitis erkrankten TGI, bei welcher zusätzlich Herpesviren im Maulhöhlentupfer nachgewiesen wurden. Dies legt die Vermutung nahe, daß sich diese TGI in einer Phase massiver Virusausscheidung befand und somit eine optimale Voraussetzung für die Isolation des Virus auch aus dem Kloakentupfer gegeben war.

### **5.2.2 Neutralisationstest mit drei Herpesvirus-Isolaten**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelangten drei unterschiedliche Herpesvirusisolate im Neutralisationstest zum Einsatz. Hierbei handelte es sich um das Isolat einer *Testudo graeca graeca* und Isolate aus Leber und Zunge zweier *Testudo hermanni* aus unterschiedlichen Beständen, die im Abstand

mehrerer Jahre isoliert worden waren. Diese unterschiedlichen Isolate wurden eingesetzt, um eine möglichst große Bandbreite serologischer Reaktionen zu erfassen. Gegen das Virusisolat aus der Zunge einer *Testudo hermanni* wurden besonders hohe Antikörpertiter erreicht.

Als positiv wurden all jene untersuchten Serumproben bewertet, bei denen neutralisierende Antikörper gegen mindestens zwei der drei eingesetzten Herpesvirusisolate nachgewiesen werden konnten. Dies war bei allen positiven Proben der Fall. 37 von 39 Proben zeigten ein durchgängig positives Ergebnis für alle drei eingesetzten Virusisolate. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man zusammenfassend bemerken, daß abhängig vom verwendeten Virusisolat unterschiedlich hohe Titer neutralisierender Antikörper im Serum der untersuchten Schildkröten nachgewiesen wurden. Der Anteil seropositiver Proben blieb jedoch nahezu unbeeinflusst. FROST und SCHMIDT (1997) konnten im Laufe der von ihnen durchgeführten Arbeit keine signifikanten Unterschiede der Virusisolate im Herpesvirus-NT feststellen. MARSCHANG (1999b) bzw. MARSCHANG et al. (2001a) berichteten hingegen von einem deutlichen Unterschied in einer vergleichenden Studie über den Einsatz verschiedener Virusisolate im Herpesvirus-Neutralisationstest unterschiedlicher Schildkröten. Hierbei unterschied sich ein untersuchtes Virusisolat im Ergebnis des Neutralisationstests von allen anderen. Dabei handelte es sich um das Isolat einer russischen Steppenschildkröte (*Testudo (Agrionemys) horsfieldii*) aus Deutschland. Bei BIERMANN (1995) unterschied sich ein Isolat stark von den anderen im Kreuzneutralisationstest. Auch bei diesem abweichenden Ergebnis handelte es sich um das Isolat einer *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*



aus Deutschland. Die anderen eingesetzten Virusisolate zeigten in den beiden Untersuchungen wie in der vorliegenden Arbeit eine weitgehende Kongruenz im Herpesvirus-Neutralisationstest. Die Übereinstimmung beider Untersuchungen spricht für die Annahme, daß unterschiedliche Subtypen von Herpesviren bei Schildkröten bestehen. Dabei spielt die Schildkrötenspezies, zumindest die russische Vierzehenschildkröte betreffend, vermutlich eine entscheidende Rolle. Neuere Untersuchungen unter Einsatz molekularbiologischer Methoden von ALEXY und BLAHAK scheinen dies zu bestätigen (BLAHAK, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Studie zeigten bei den Untersuchungen auf Herpesvirus-Antikörper insgesamt 11,9 % der untersuchten Schildkröten ein positives Ergebnis im Neutralisationstest. Dabei wiesen 19,9 % der in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten ein positives Ergebnis auf. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Maurische Landschildkröten (TGG und TGI), keine in Gefangenschaft gehaltene THH zeigte ein positives Ergebnis im Herpesvirus-NT. Bei in Gefangenschaft gehaltenen Maurischen Landschildkröten wiesen 24,2 % TGG und 74,2 % TGI ein positives Testergebnis im Herpesvirus-Neutralisationstest auf. Kein einziges von 133 untersuchten freilebenden Tieren, also weder freilebende THH in Frankreich, noch wildlebende TGG in Marokko, wiesen ein positives Ergebnis im Herpesvirus-Neutralisationstest auf. Bisher lagen in der Literatur keine Untersuchungen an freilebenden Schildkröten auf Herpesviren vor. Interessant wäre eine adäquate Untersuchung von freilebenden *Testudo graeca iberica* in ihrem Ursprungsland.

In der Literatur existieren bereits diverse Untersuchungen auf Herpesvirus-Antikörper mittels Neutralisationstest bei Schildkröten (WITTE und BLAHAK, 1993; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 1999b; NIE und LU, 1999; SCHMIDT, 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MARSCHANG et al., 2001b; ORIGGI et al., 2001b). Im Laufe dieser Untersuchungen wurden unter anderem Vergleiche der Herpesvirus-NT-Resultate bei *Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, *Testudo (Agrionemys) horsfieldii*, und *Testudo marginata* durchgeführt. FROST und SCHMIDT (1997) bzw. SCHMIDT (2000) wiesen zusätzlich Herpesvirus neutralisierende Antikörper bei diversen anderen Schildkrötenarten, unter anderem bei *Testudo kleinmanni*, *Chelonoidis carbonaria*, *Geochelone pardalis* und *Gopherus agassizii* nach. Vergleicht man die Anzahl der positiven Tiere der unterschiedlichen Spezies in den diversen Studien miteinander, so läßt sich durchgängig feststellen, daß *Testudo graeca* deutlich häufiger als *Testudo hermanni* positive Testergebnisse aufwiesen (FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 1999b; SCHMIDT, 2000). Auch beim Vergleich der im Herpesvirus-Neutralisationstest gemessenen Titer erzielten untersuchte *Testudo graeca* wesentlich größere Werte als *Testudo hermanni* (KABISCH und FROST, 1994; MARSCHANG, 1999b; SCHMIDT, 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MARSCHANG et al., 2001b). Diese Ergebnisse des Herpesvirus-NT decken sich hinsichtlich der Speziesunterschiede von Maurischen und Griechischen Landschildkröten mit denen in der vorliegenden Arbeit. In keiner der erwähnten Veröffentlichungen wurden allerdings Daten getrennt nach *Testudo graeca*

*graeca* und *Testudo graeca iberica* aufgeführt, so daß ein Vergleich mit den im Rahmen der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnissen diesbezüglich nicht möglich ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Herpesvirus-Neutralisationstest, wobei *Testudo graeca* häufiger positive Ergebnisse zeigte als *Testudo hermanni*, konnten Viren ebenso regelmäßig aus TH wie aus TG isoliert werden. Bei THH gelang zwar seltener und in geringerer Höhe der Nachweis von Herpesvirus-Antikörpern im Blut, diese Tatsache sollte allerdings nicht zu der Annahme führen, daß *Testudo hermanni* weniger empfänglich für Herpesvirusinfektionen als andere Schildkrötenspezies sind. Gerade die höhere Empfänglichkeit der TH könnte zu einer geringeren Bildung von Antikörpern gegen Herpesviren und eher zu klinischen Erscheinungen und zum Tod der infizierten Tiere als bei den *Testudo graeca* führen. So gelang in Tupfer- und Organproben schwer erkrankter oder verstorbener TH regelmäßig der Nachweis von Herpesviren (BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; LANGE et al., 1989; MÜLLER et al., 1990; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; BLAHAK und BIERMANN, 1995; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG et al., 1997b; POSTHAUS et al., 1997; WENKER et al., 1997; DRURY et al., 1998; DRURY et al., 1999b; KÜBBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 1999b; SCHMIDT, 2000; TEIFKE et al., 2000; MARSCHANG et al., 2001a; MCARTHUR, 2001). TG scheinen in vielen Fällen in der Lage zu sein, sich mit dem Herpesvirus auseinanderzusetzen, dementsprechend vermehrt Antikörper zu bilden und eine Herpesvirusinfektion unter bestimmten Umständen zu überstehen. So sollten auch die in der vorliegenden Studie gefundenen

Speziesunterschiede in Bezug auf die Bildung von Herpesvirus-Antikörpern interpretiert werden.

Bei der Ermittlung der Unterschiede bezüglich des Geschlechtes der untersuchten Tiere konnten im Zuge der vorliegenden Arbeit im Herpesvirus-NT keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchung von FROST und SCHMIDT (1997), bei welcher ebenso wenig eine Geschlechtskorrelation festgestellt werden konnte. Der scheinbare Zusammenhang zwischen Alter und Herpesvirus-NT-Ergebnis in der vorliegenden Arbeit hing vermutlich nicht tatsächlich mit dem Alter der untersuchten Tiere zusammen. Zwar zeigte keines der untersuchten juvenilen Tiere ein positives Ergebnis im Herpesvirus-NT. Dieser Umstand hing jedoch vermutlich mit der Tatsache zusammen, daß alle juvenilen Tiere THH waren und wies somit vermutlich wiederum auf einen Speziesunterschied hin. Zusätzlich erfolgte eine getrennte Unterbringung der untersuchten Landschildkröten im Schildkrötendorf in Gonfaron. Somit konnten zusätzliche die Seroprävalenz beeinflussende Faktoren nicht sicher ausgeschlossen werden. In der Literatur liegen bisher keine Untersuchungen bezüglich der Altersrelevanz für den Herpesvirus-Neutralisationstest der Schildkröten vor.

### **5.2.3 Herpesviren und klinische Erkrankungen**

Wie bereits erwähnt, fällt eine strikte Abgrenzung der durch Mykoplasmen oder Herpesviren ausgelösten Symptome in der vorliegenden Studie schwer bzw. ist sogar unmöglich. Dies scheint nicht nur bei dieser Arbeit der Fall zu sein. In der Literatur zeigt sich allmählich eine Veränderung der durchgeführten

Untersuchungen und deren Interpretationen. Die Schnupfensymptomatik erscheint zunächst, wenn überhaupt, eher als Begleitsymptom der Verlegung des oberen Verdauungstraktes durch käsige Beläge. Bei den meisten bisher über die Herpesvirose vorliegenden Berichten steht die Stomatitis als Hauptsymptom im Vordergrund (HOLT und COOPER, 1976; HARPER et al., 1982; COOPER et al., 1988; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; LANGE et al., 1989; BIERMANN und BLAHAK, 1993; POSTHAUS et al., 1997; KÜBBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 1999a). Erst in den letzten Jahren wird auch im Zusammenhang mit Rhinitiden, Tracheitiden und Pneumonien als Leitsymptome der erkrankten Landschildkröten verstärkt nach Herpesviren geforscht. Zwar hatten einige andere Autoren schon weit früher eine virale Grundursache vermutet, der Nachweis war bis 1996 aber nicht erfolgreich gewesen.

PETTAN-BREWER et al. (1996) gelang erstmals der lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Nachweis von Herpesviren bei *Gopherus agassizii* mit einer vorherrschenden Erkrankung des Respirationstraktes. MURO et al. (1998) diagnostizierten Herpesviren bei *Testudo graeca graeca* mit chronischer Rhinitis in Spanien. Die klinisch auffälligen Tiere wiesen laut MURO et al. zunächst eine bilaterale seromuköse Rhinitis auf, bevor sich zum Teil im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Stomatitis, Glossitis und Siallorhoe entwickelte. Auch hier wurde der Nachweis mittels Licht- und Elektronenmikroskop durchgeführt. Eine Anzüchtung der Herpesviren hatte bisher bei Landschildkröten mit hauptsächlich respiratorischen Symptomen keinen Erfolg. Das einzige Tier, aus welchem im Zuge dieser Arbeit

Herpesviren isoliert werden konnte, zeigte eine hochgradige Rhinitis und hochgradige Stomatitis. Aussagen über die Isolation von Herpesviren bei Schildkröten, welche lediglich eine chronische Rhinitis aufwiesen, konnten daher auch in dieser Studie nicht getroffen werden. MARSCHANG (1999b) isolierte Herpesviren aus dem Rachentupfer einer scheinbar gesunden *Testudo hermanni*. Auch bei MARSCHANG zeigte allerdings der Großteil der Schildkröten, aus denen Herpesviren aus dem Rachentupfer isoliert werden konnte, klinische Erscheinungen (Stomatitis, Pneumonie, Pharyngitis etc.)

#### **5.2.4 Weitere Auslöser des Rhinitis-Stomatitis-Komplexes und zur Krankheit beitragende Streßfaktoren**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten in den verwendeten Verfahren Herpesviren in den Tupferproben und Antikörper gegen Herpesviren im Blut nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß keine weiteren Viren bei den durchgeführten Untersuchungen gefunden wurden, schließt die Möglichkeit zusätzlich bestehender oder auslösender Virusinfektionen nicht aus. In der Literatur finden sich einige Beispiele für das Auftreten multipler Virusinfektionen bei ein und demselben Reptil oder aber Tieren eines Bestandes. So erwähnt JACOBSON (1993) den Fall zweier Schlangen, die gleichzeitig mit Adenoviren, Parvoviren, Picornaviren und Herpesviren infiziert waren (HELDSTAB und BESTETTI, 1984). Es wurden in dieser Publikation weder Isolationsversuche beschrieben noch ein kausaler Zusammenhang zwischen den Virusinfektionen erstellt. RAYNAUD (1982) berichtete von kutanen Papillomen bei Smaragdeidechsen (*Lacerta viridis*), bei denen gleich drei Viren nachgewiesen

werden konnten. In einem Papillom wurden Reoviren, Papovaviren und Herpesviren im Semidünnschnitt festgestellt. MARSCHANG (1999b) gelang der Nachweis von Virus X gehäuft bei Tieren, in deren Bestand auch Herpesviren nachgewiesen wurden. Somit sollte die Möglichkeit einer Infektion mit weiteren Viren auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

Neben multiplen Virusinfektionen kommen noch weitere Faktoren in Frage, welche zur Verschlimmerung der auftretenden Krankheitssymptome beitragen können. Besonders Streßfaktoren multipler Genese scheinen sowohl bei Mykoplasmen- als auch bei Herpesvirusinfektionen Auswirkungen auf den Ausbruch und Verlauf der Krankheit zu haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine bakteriologischen, mykologischen oder parasitologischen Reihenuntersuchungen der getesteten Tiere vorgenommen werden. Daher soll an dieser Stelle auf einige der bereits im Literaturteil erwähnten unterschiedlichen Faktoren eingegangen und deren wahrscheinliche Relevanz im Rahmen der durchgeführten Studie diskutiert werden.

Erkrankungen des Atmungs- oder oberen Verdauungstraktes aufgrund einer parasitären Infektion sind bei Landschildkröten eher selten, so daß diese Möglichkeit als Differentialdiagnose als Auslöser von Rhinitis und/oder Stomatitis bei der vorliegenden Arbeit eher in den Hintergrund tritt.

Eine fungale Infektion bei an Rhinitis und/oder Stomatitis erkrankten Schildkröten kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. So wiesen zum Beispiel HOMER et al. (1998) neben an Mykoplasmose erkrankten

Wüstenschildkröten auch bei einem Tier eine Pilzinfektion des Respirationstraktes nach. Bisher konnte nach Wissen der Autorin allerdings bei Landschildkröten kein massenhaftes Auftreten von Pilzinfektionen der Lunge beobachtet werden.

Eine bakterielle Sekundärinfektion als Komplikation einer bestehenden Infektion mit Herpesviren und/oder Mykoplasmen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht sicher ausgeschlossen werden. Unter den Bakterien kommen bei Erkrankungen des Atmungs- und Verdauungstraktes der Landschildkröten vor allem *Pasteurella testudinis* in Betracht. Pasteurellen gehören nach SNIPES et al. (1980), SNIPES und BIBERSTEIN (1982) und SNIPES (1984) zur normalen Flora des oberen Respirations- und Digestionstraktes von Landschildkröten. Erst bei Streß, der zum Beispiel durch Gefangenschaftshaltung ausgelöst wird, kommt es zu klinischen Erkrankungen des Respirationstraktes aufgrund von Pasteurellen, v. a. durch *Pasteurella testudinis*. SNIPES (1984) vermutete eine virale oder andere Infektion als Grundursache oder Begleiterscheinung der respiratorischen Erkrankung der Landschildkröte. Auch JANG und BIBERSTEIN (1991) sprachen den Pasteurellen eher die Rolle eines opportunistischen Keimes mit pathogenen Fähigkeiten zu. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der von BROWN et al. (1994) durchgeführten Übertragungsstudie, in welcher *Pasteurella testudinis* alleine nicht zum Auslösen der URTD bei Wüstenschildkröten führte. Erst die intranasale Instillation von Pasteurellen in Kombination mit Mykoplasmen, Mykoplasmen alleine oder aber nasales Exsudat aus an URTD erkrankten Wüstenschildkröten führte zur Ausbildung respiratorischer Krankheitserscheinungen bei zuvor



gesunden Tieren. SNIPES (1984) vermutete eine durch Streß ausgelöste Pathogenität dieser Schleimhautkommensalen. SNIPES et al. (1995) versuchten einen spezifisch pathogenen Stamm von *Pasteurella testudinis* nachzuweisen. Dieser Versuch mißlang und deckte sich mit den bei zuvor durchgeführten Studien gewonnenen Erkenntnissen (SNIPES et al., 1995). Eine Mitbeteiligung von Pasteurellen am Krankheitsgeschehen kann in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden, da eine Untersuchung auf diese Keime nicht möglich war. Eine allein auslösende Wirkung von *Pasteurella testudinis* kann aber aufgrund der aufgeführten Untersuchungen bezüglich dessen Pathogenität als unwahrscheinlich eingestuft werden.

Laut FOWLER (1980a) stehen squamöse metaplastische Veränderungen der Schleimhäute von Atmungs- und Verdauungstrakt bei in Gefangenschaft gehaltenen Wüstenschildkröten im Zusammenhang mit Hypovitaminose A. Diese Beobachtung konnte von JACOBSON et al. (1991b) bei der URTD von wildlebenden Wüstenschildkröten nicht bestätigt werden. FRYE (1989) beschreibt die Vitamin A-Mangelerkrankung v. a. bei semiaquaten Schildkröten. Landschildkröten sind durch die in der Regel erfolgende Aufnahme von frischem, abwechslungsreichen Grünfutter mit darin enthaltenen natürlichen Karotinoiden weniger anfällig für diese Erkrankung (FRYE, 1989). Somit erscheint eine durch Hypovitaminose A ausgelöste Erkrankung der Respirations- und Digestionstraktes bei den in dieser Studie in Frankreich untersuchten terrestrisch lebenden Tieren eher unwahrscheinlich. Bei den wildlebenden *Testudo graeca* hingegen ist es aufgrund der zum Teil recht kargen Fauna in Marokko zumindest theoretisch denkbar.

Multiple Faktoren könnten als „Streß“ zu einer Auslösung oder Verschlimmerung der Krankheit bei den an Rhinitis und/oder Stomatitis erkrankten Landschildkröten beigetragen haben. Dabei kommen unter anderem Trockenheit, geringes Futterangebot, hohe Besatzdichte und inadäquate Unterbringung in Frage. Auch immunschwächende Faktoren wie Winterschlaf, Gefangennahme, Transport oder starker Endoparasitenbefall könnten dabei eine Rolle spielen (ROSSKOPF, 1990; JACOBSON et al., 1991b; BONIN, 1992; JACOBSON, 1992; SCHUMACHER et al., 1992; BROWN et al., 1994; LEDERLE et al., 1997; SCHUMACHER et al., 1997; BROWN et al., 1999b; MCLAUGHLIN et al., 2000).

Nicht zu den an Rhinitis erkrankten Tieren wurden jene gezählt, deren festes, eingetrocknetes Nasensekret erst bei Spülung der Nasenhöhle sichtbar wurde. Dieses Phänomen trat vor allem bei den in Marrakesch getesteten *Testudo graeca graeca* häufiger auf. In der Umgebung von Marrakesch herrschte zur Zeit der Probennahme ein sehr trockenes Klima. Zusätzlich lebten die Tiere in einer sehr staubigen Region. In diversen Publikationen werden Trockenheit, Staub und weitere prädisponierende Umweltbedingungen als mögliche die URTD der Landschildkröten mit auslösende Faktoren erwähnt (JACOBSON et al., 1991b; JACOBSON, 1992; SCHUMACHER et al., 1992; BROWN et al., 1994; LEDERLE et al., 1997; SCHUMACHER et al., 1997; BROWN et al., 1999c; MCLAUGHLIN et al., 2000; JACOBSON et al., 2003 - in press). Dabei gaben zum Beispiel JACOBSON et al. (1991b) auch eine schlechtes Nährstoffangebot als möglichen Kofaktor der Erkrankung an. Betrachtet man das eher dürftige Nahrungsangebot für in Marokko freilebende *Testudo graeca*

*graeca* im Hochsommer, so sollte dieser Faktor durchaus auch in der vorliegenden Studie mit berücksichtigt werden.

Auch bei der Herpesvirusinfektion der Meeresschildkröten erwähnten diverse Autoren Streß, Temperatur und Besatzdichte als mögliche zur Krankheit beitragende Faktoren (REBELL et al., 1975; HAINES und KLEESE, 1977; REME, 1980). Dies läßt sich ebenso auf Landschildkröten übertragen. So beschrieb MAUNG (1963) bei Landschildkröten eine langsamere Reaktion auf eine Immunisierung im Sommer als im Winter. Dies könnte neben anderen Stoffwechselvorgängen mit der temperaturabhängigen Syntheserate von Antikörpern bei Poikilothermen zu erklären sein. Immer wieder fanden in der Literatur Krankheitsausbrüche bei Schildkröten nach Transport und Import Erwähnung (JACOBSON et al., 1985; MÜLLER et al., 1990; UNE et al., 1999; MCLAUGHLIN et al., 2000; HERVAS et al., 2002). Viele der in der vorliegenden Studie in Gefangenschaft gehaltenen untersuchten Tiere waren erst kurz zuvor in das Schildkrötendorf gebracht worden, bzw. einer hohen Besatzdichte in den Gehegen des Dorfes ausgesetzt gewesen. Somit könnte dieser Streßfaktor durchaus eine Rolle in den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen gespielt haben. Diverse Autoren erwähnen Winterschlaf in Verbindung mit eventuell durch Herpesviren oder Mykoplasmen ausgelöste Erkrankungen der Schildkröten (HOLT und COOPER, 1976; LAWRENCE und NEEDHAM, 1985; BRAUNE et al., 1989; PETTAN-BREWER et al., 1996; MURO et al., 1998; SCHMIDT, 2000). Als mögliche Ursache dieser Tatsache wurde ein Abfall der Aktivität des Immunsystems und eine daraus resultierende reduzierte Antikörperbildung vermutet (AMBROSIUS, 1976; BLAHAK, 2000b; SCHMIDT,

2000). Die Probenentnahme in der vorliegenden Studie in Frankreich begann 1997 bereits im Mai, also nur einige Wochen nach Erwachen der Tiere aus dem Winterschlaf. Somit sollte eine eventuell nach dem Winterschlaf bestehende Schwächung des Immunsystems bei der Interpretation der hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse Berücksichtigung finden.

Als Streßfaktor im weiteren Sinne könnte auch eine starke Belastung mit Endoparasiten angesehen werden. BONIN (1992) stellte eine mögliche Beziehung zwischen der kontagiösen Rhinitis von *Testudo graeca* in Frankreich und Parasiten des Digestionstraktes dar. Dabei betrachtete der Autor einen starken Wurmbefall des Darmes als zusätzliche Belastung für ein bereits durch Rhinitis geschwächtes Tier. Mit entsprechender antiparasitärer Therapie konnte in dieser Studie zumindest zu einer Verbesserung des Allgemeinzustandes einer an URTD erkrankten Schildkröte beigetragen werden (BONIN, 1992). Die von BONIN erhaltenen Resultate der parasitären Untersuchungen zeigten die Prävalenz von Parasiten des Digestionstraktes bei *Testudo graeca* in Frankreich. Daher sollte in jedem Falle eine Kotuntersuchung und entsprechende antiparasitäre Therapie bei an URTD erkrankten Tieren durchgeführt werden. Dies deckt sich mit den Empfehlungen von ROSSKOPF (1990) bei an URTD erkrankten Schildkröten in Amerika.

## **5.3 Korrelationen und Kontrolle**

### **5.3.1 Synergismus von Herpesviren und Mykoplasmen ?**

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte sowohl ein Zusammenhang zwischen dem Gesundheitszustand der Schildkröten und Mykoplasmen als auch zwischen dem Gesundheitszustand und Herpesviren festgestellt werden. Zusätzlich konnte erstmals eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Untersuchungen auf Herpesvirus-Antikörper und Mykoplasmen-Antigen nachgewiesen werden. Noch stärker erwies sich der Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des Mykoplasmen-ELISA und des Herpesvirus-Neutralisationstests in der vorliegenden Arbeit. Ob die Tiere wirklich gleichzeitig mit Mykoplasmen und Herpesviren infiziert waren oder ob die Infektionen nacheinander abliefen, läßt sich aus den Ergebnissen nicht ablesen. Es erscheint folgerichtig, daß die Infektion eines Organsystems mit einem Erreger zur Abwehrschwäche und damit zu erleichterter Sekundärinfektion führt. Theoretisch können Herpesviren als Wegbereiter der Mykoplasmen fungieren, aber auch der umgekehrte Fall scheint durchaus denkbar. Von Herpesviren und Mykoplasmeninfektionen ist bekannt, daß sie zu einer chronischen Schwächung des Organismus führen. Damit stellen beide mögliche Wegbereiter für weitere Infektionen dar. Bei beiden Pathogenen handelt es sich um Erreger, welche eine dauernde Bedrohung für den Organismus darstellen. Herpesvirusinfektionen sind bekannt für ihre Latenzphasen, die sich mit Phasen von klinischen Erkrankungen aufgrund verschiedener Faktoren (Streß, schlechte Umweltbedingungen, andere Erkrankungen etc.) abwechseln

(CHEVILLE, 1994). Ein ähnlicher Krankheitsverlauf wird auch bei Mykoplasmeninfektionen freilebender Gopherschildkröten in einer Studie von BROWN et al. (1999b) beschrieben. Die Ergebnisse der in der Kalifornischen Wüste gemachten Untersuchungen gaben Grund zu der Annahme, daß es sich auch hier um eine zyklisch verlaufende chronische Infektion handelt, bei welcher der Erreger auch in Phasen klinischer Inapparenz im Wirt verblieb und unter bestimmten Bedingungen erneut zu klinischer Erkrankung der Tiere führen konnte. Bezogen auf die vorliegende Arbeit erscheint es daher durchaus möglich, daß bei nachgewiesener Infektion mit Herpesviren und Mykoplasmen klinisch inapparente Phasen mit Perioden massiver Krankheitsschübe in Form von Stomatitis und/oder Rhinitis durch Wechsel oder gegebenenfalls gleichzeitigen Ausbruch beider Erreger entstanden. Somit müssen die während der klinischen Untersuchung einmalig erhobenen Befunde und Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen immer als Momentaufnahme gewertet werden und lassen nur bedingte Aussagen über den tatsächlichen Infektionsstatus der Tiere bei beiden Erregern zu.

In der Literatur erfolgte bisher nur selten eine gleichzeitige Untersuchung von Viren und Mykoplasmen bei Schildkröten. Obwohl diverse Autoren immer wieder einen Zusammenhang zwischen Viren und Mykoplasmen vermuteten und entsprechende Untersuchungen durchführten, konnte bisher kein direkter Beweis dieser These erbracht werden (JACOBSON et al., 1991b; MCLAUGHLIN, 1997). MURO et al. (1998) vermuteten zwar eine Mitbeteiligung von Mykoplasmen an der chronischen Rhinitis einer Herpesvirus-positiven *Testudo graeca graeca* in Spanien, eine Anzüchtung von Mykoplasmen erfolgte

jedoch nicht. Die vorliegende Arbeit könnte den Verdacht erwecken, daß ein eventueller Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer Infektion mit Herpesviren bzw. gegen diese gerichtete Antikörper und einer Infektion mit Mykoplasmen bzw. gegen diese gerichtete Antikörper bei den getesteten Landschildkröten besteht.

### **5.3.2 Therapie, Vakzine und empfohlene Präventivmaßnahmen**

Weder bei der Herpesvirusinfektion noch bei der Mykoplasmosen der Landschildkröten konnte bisher eine befriedigende Therapieform gefunden werden.

Vakzinierungsversuche gegen Herpesviren bei Landschildkröten wurden erstmals von MARSCHANG et al. (2001b) durchgeführt. Dabei führte die Vakzinierung nicht zu einem signifikanten Anstieg neutralisierender Antikörper. Somit obliegt bis auf weiteres das Hauptaugenmerk zur Vermeidung der Infektion in der ausreichenden Quarantäne und der mehrfachen Testung neuerworbener Schildkröten. Hierbei sollte laut FROST und SCHMIDT (1997) eine Wiederholung der serologischen Tests im Abstand von mindestens sechs Wochen durchgeführt werden, um so die diagnostische Lücke zwischen Infektion und serologischer Reaktion zu verringern. Bei einer von MARSCHANG et al. (2001b) in Italien durchgeführten Studie zeigten sich starke Differenzen bei der wiederholten serologischen Testung auf Herpesviren, so erfolgte bei allen antikörperpositiven Schildkröten ein zeitweiliger Abfall der Titer unter einen messbaren Wert. Aufgrund dieser Erkenntnisse und praktischer Erfahrung sollten Neuzugänge mindestens über eine, besser mehrere

Winterschlafperioden isoliert gehalten und einige Wochen nach dem Winterschlaf mindestens einmal erneut getestet werden, bevor sie zunächst nur zu wenigen Tieren eines größeren Bestandes gesetzt werden. Erst nach wiederholt negativem serologischen Testergebnis und einem negativen Ergebnis einer versuchten Virusisolierung mittels Maulhöhlenabstrich oder mit Speichel benetztem Maulhöhlentupfer und mehrfach unbeschadet überstandenen Winterschlaf sollte das Risiko eines Neuzusatzes in einen etablierten Bestand vorgenommen werden. Auf jeden Fall sollte ein Neuzugang immer wie ein potentiell mit Herpesviren infiziertes Tier behandelt werden und unbedingt eine konsequente Trennung der unterschiedlichen Landschildkrötenunterarten aufgrund der beschriebenen Spezies-, bzw. Subspeziesrelevanz eingehalten werden.

Nach wiederholter Infektion mit *Mycoplasma agassizii* entstand in adulten Gopherschildkröten trotz meßbarer Antikörpertiter keine Immunität gegen die URTD. Im Gegenteil, es kam bei reinfizierten Tieren zu stärker ausgeprägten klinischen Symptomen und schnellerem Antikörperanstieg (MCLAUGHLIN, 1997; SCHUMACHER et al., 1999). Aufgrund dieser Befunde erscheint die Empfehlung einer Vakzinierung der Landschildkröten gegen eine Infektion mit Mykoplasmen zum gegenwärtigen Zeitpunkt als wenig sinnvoll. Auch sollten sowohl Untersuchungen auf Mykoplasmen mittels Kultivierung und PCR der Nasenspülprobe als auch auf Antikörper gegen Mykoplasmen mittels ELISA durchgeführt werden. Sorgfältige, wiederholte Untersuchungen, mehrmonatige bis mehrjährige strikte Quarantäne und Trennung von Neuzugängen stellen somit auch bei der Mykoplasmose den wichtigsten Teil der



Präventivmaßnahmen zur Vermeidung der Ausbreitung der URTD der Landschildkröte dar. Auch hier gilt der Grundsatz, daß theoretisch jede Schildkröte ein potentieller Träger der URTD ist, ohne zunächst klinische Symptome zeigen zu müssen. Dementsprechend zu treffende Vorsichtsmaßnahmen sind somit essentiell für den Erhalt eines gesunden Schildkrötenbestandes.

JACOBSON et al. (1995) beobachteten die größte Prävalenz der URTD bei *Gopherus agassizii* in Nevada an jenen Lokalisationen, wo kurz zuvor Auswilderungen in Gefangenschaft gehaltener Wüstenschildkröten stattgefunden hatten. Entsprechende Untersuchungen wurden bisher in Bezug auf die Herpesvirusinfektion der Landschildkröten noch nicht durchgeführt. Aufgrund der divergenten Ergebnisse freilebender und in Gefangenschaft gehaltener Schildkröten im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten allerdings auch dort ähnliche Resultate zu erwarten sein. Daher sollte möglichst keine Relokalisation von ehemals in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten in Gebiete mit Wildpopulationen erfolgen.

### **5.3.3 Abschlußbemerkungen**

Faßt man einige wichtige Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zusammen und versucht dabei einige Empfehlungen für die Praxis zu geben, so gelangt man zu folgenden Hauptpunkten:

Die von den Schildkröten gezeigten klinischen Symptome lassen keinen zuverlässigen Schluß auf den Infektionsstatus der Tiere zu. Dies gilt sowohl für

Mykoplasmen als auch für Herpesviren. Ebenso wenig lässt sich aufgrund einmaliger negativer Testergebnisse eine zuverlässige Aussage über das Nichtbestehen einer Infektion mit Herpesviren und/oder Mykoplasmen treffen.

Es sollte immer eine Kombination der Untersuchungen auf Herpesviren und Mykoplasmen bei fraglichen Schildkröten durchgeführt werden. Die Nachweiswahrscheinlichkeit positiver Proben mit den verschiedenen Methoden variiert je nach Infektions- bzw. Untersuchungszeitpunkt nach der Infektion. Da der Zeitpunkt der Infektion in den seltensten Fällen bekannt sein dürfte, ist sowohl bei den Mykoplasmen als auch bei den Herpesviren in der Regel eine gleichzeitige Untersuchung auf krankheitsauslösende Agenzien und entsprechende Antikörper empfehlenswert.

Es sollte möglichst keine Aufnahme von Fundtieren oder ungetesteten Neuzugängen in einen Bestand erfolgen. Falls unvermeidbar, sollte zumindest jeder Neuzugang ungeachtet bestehender Symptome grundsätzlich als möglicher inapparenter Infektionsträger gewertet und behandelt werden.

Quarantäne der Neuankömmlinge über einen adäquaten Zeitraum ist genauso wichtig wie die Vermeidung von Streß für ein neu in den Bestand gekommenes Tier und eine aufmerksame Beobachtung des Neulings.

Trennung der unterschiedlichen Schildkrötensubspezies ist eine absolut notwendige Maßnahme. Die bisher immer noch bestehende Angewohnheit der Haltung verschiedener Arten und Unterarten in einem Gehege sollte spätestens nach den vorliegenden Ergebnissen obsolet sein.

---

Eine Auswilderung in Gefangenschaft gehaltener Schildkröten in Gebiete mit naiven wildlebenden Populationen ist nicht sinnvoll. Neben den bisher vorliegenden Untersuchungen ist eine ähnliche Verteilung anderer krankheitsauslösender Agenzien neben den Mykoplasmen und Herpesviren bei freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten mehr als wahrscheinlich. Die bisher eventuell fehlenden Nachweismöglichkeiten weiterer Krankheitserreger rechtfertigen somit keine Rückführung von Mykoplasmen- und Herpesvirus-negativen Tieren in Gebiete naiver Wildpopulationen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, das Vorkommen von Mykoplasmen und Herpesviren bei mediterranen Landschildkröten zu bestimmen. Hierzu wurden in den Jahren 1996 und 1997 insgesamt 329 freilebende und in Gefangenschaft gehaltene Maurische und Griechische Landschildkröten untersucht. Bei den 133 freilebenden Schildkröten handelte es sich um 93 Tiere der Subspezies *Testudo hermanni hermanni* (THH) in Frankreich und 40 Vertreter von *Testudo graeca graeca* (TGG) in Marokko. Die 196 in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten verteilten sich auf THH (n = 99), TGG (n = 66) und *Testudo graeca iberica* (TGI; n = 31). Von jedem Tier wurden eine Nasenspül-, eine Zungen- und eine Kloakaltupferprobe sowie eine Blutprobe entnommen. Die Nasenspülproben wurden mittels Anzuchtverfahren sowie einer genusspezifischen Polymerasekettenreaktion (16S-rRNA-PCR) auf Mykoplasmen untersucht. Zum Nachweis von Herpesviren wurde Material der Zungen- und Kloakaltupferproben auf Reptilienzellen (TH1-Zellen) kultiviert und mittels Elektronenmikroskopie näher untersucht. Die Blutproben wurden mit einem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf Antikörper gegen *Mycoplasma agassizii* und in einem Neutralisationstest (NT) unter Verwendung von drei verschiedenen Virusisolaten auf Herpesvirus-neutralisierende Antikörper geprüft.

Bei fast allen Untersuchungen bestanden zwischen freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten sowie zwischen den Spezies/Subspezies erhebliche Unterschiede. So ergab die klinische

Untersuchung bei 36 (10,9 %) Tieren Anzeichen einer Rhinitis und/oder Stomatitis. Von Krankheitssymptomen war insbesondere ein hoher Anteil (39,4 %) der in Gefangenschaft gehaltenen TGG betroffen. Aber auch gefangene TGI zeigten Symptome (9,7 %).

Die Untersuchung der Nasenspülproben mittels Anzuchtverfahren und PCR ergab übereinstimmend, daß 8 (2,4 % aller Tiere) in Gefangenschaft gehaltene Maurische Landschildkröten (TGG und TGI) mit Mykoplasmen infiziert waren. Mit einer Restriktionsenzymanalyse der Amplifikationsprodukte aus dem 16S-rRNA-Gen wurden diese *Mycoplasma*-Isolate der Spezies *Mycoplasma agassizii* zugeordnet. Dabei waren fünf der Isolate in ihren Bandenmustern von dem *Mycoplasma-agassizii*-Referenzstamm PS6 nicht zu unterscheiden. Bei drei Isolaten war eine zusätzliche Sau96 I-Schnittstelle vorhanden, die auf einer bisher unbekannten Punktmutation an Position 802 beruhte (Deletion von Adenosin bei den drei abweichenden Isolaten).

Bei 102 (31 %) Schildkröten waren Antikörper gegen *Mycoplasma agassizii* nachweisbar, wobei 29 der freilebenden (21,8 %) und 73 der in Gefangenschaft gehaltenen Tiere (37,2 %) positiv reagierten. Und auch der Titermittelwert der freilebenden Schildkröten war signifikant niedriger als derjenige von Tieren in Gefangenschaft ( $p < 0,0005$ ). In beiden Gruppen war TGG (45 % der freilebenden TGG, 63,6 % der in Gefangenschaft gehaltenen TGG) häufiger betroffen als THH (11,8 % der freilebenden THH, 10,1 % der in Gefangenschaft gehaltenen THH). Bei den Tieren in Gefangenschaft reagierten TGI (67,7 %) prozentual am häufigsten serologisch positiv.

Ein Herpesvirus-verdächtiges, zytopathogenes Virus konnte nur von einer einzigen Schildkröte, einer weiblichen TGI mit Stomatitis und Rhinitis, isoliert werden, wobei das Virus sowohl aus dem Zungentupfer als auch aus dem Kloakaltupfer anzuzüchten war. Im Herpesvirus-Neutralisationstest reagierten 39 (11,9 %) Tiere positiv mit mindestens zwei der eingesetzten Virusisolate. Hierbei konnten neutralisierende Antikörper aber ausschließlich bei in Gefangenschaft gehaltenen TGG und TGI nachgewiesen werden. THH oder freilebende TGG reagierten im Herpesvirus-NT stets negativ. In Gefangenschaft gehaltene TGI kamen besonders häufig zu positiven Herpesvirus-NT-Ergebnissen, wenngleich die Titer bei TGG und TGI etwa die gleichen Maxima erreichten.

Die Korrelationsanalyse der Daten ergab vielfach signifikante Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern. So waren Erkrankungen des oberen Respirations- und Verdauungstraktes positiv mit dem Nachweis von Mykoplasmen korreliert ( $p < 0,001$ ). Ein positiver Zusammenhang ließ sich statistisch auch zwischen den genannten Krankheitssymptomen und dem Vorhandensein von Antikörpern gegen Mykoplasmen ( $p < 0,0005$ ) und gegen Herpesviren ( $p = 0,041$ ) sichern. Zwischen den Befunden im *Mycoplasma*-ELISA und bei der kulturell-bakteriologischen Untersuchung auf Mykoplasmen bestand genauso ein hoch signifikanter Zusammenhang ( $p < 0,0005$ ) wie zwischen den Befunden der PCR-Untersuchung auf Mykoplasmen und den Befunden im Herpesvirus-NT ( $p = 0,001$ ). Ferner waren die Ergebnisse im *Mycoplasma*-ELISA mit den Ergebnissen des Herpesvirus-NT positiv korreliert ( $p < 0,0005$ ).

Die ermittelten Speziesunterschiede in der Häufigkeitsverteilung der klinischen Symptome, der Untersuchungsergebnisse auf Mykoplasmen und Herpesviren (TG>TH) legen den Schluß nahe, daß ein enger Kontakt von *Testudo graeca* und *Testudo hermanni* möglichst vermieden werden sollte. Da eine klinisch inapparente Infektion mit Erregerausscheidung bei serologisch positiven Schildkröten nicht ausgeschlossen werden kann, sollten solche Tiere haltungstechnisch stets wie infizierte Tiere behandelt und strikt abgesondert werden. Neuzugänge in einen Bestand sollten zunächst grundsätzlich als infiziert betrachtet werden. Entsprechende Vorsichtsmaßnahmen wie Quarantäne, klinische Überwachung sowie wiederholte serologische und bakteriologische/virologische Untersuchungen dieser Schildkröten sind dringend anzuraten. In menschlicher Obhut gehaltene und wieder ausgewilderte Schildkröten stellen als potentielle Träger von Pathogenen wie Herpesviren und Mykoplasmen eine Gefährdung der wenigen verbliebenen freilebenden Landschildkrötenbestände dar.

## 7 Summary

The aim of this study was to determine the incidence of mycoplasma and herpesviruses in Mediterranean tortoises. In 1996 and 1997, a total of 329 terrestrial tortoises were examined. During this study, 133 free-ranging animals, of which 93 were Hermann's tortoises, (*Testudo hermanni hermanni* =THH) in France and 40 were Mediterranean spur-thighed tortoises (*Testudo graeca graeca*= TGG) in Morocco, were evaluated. The 196 animals in captivity were THH (n=99), TGG (n=66) and *Testudo graeca ibera* (TGI; n=31). A nasal, pharyngeal and cloacal swab as well as a blood sample were taken from each animal. Nasal samples were evaluated for mycoplasma using culture and a genus-specific polymerase chain reaction (16S-rRNA-PCR). Pharyngeal and cloacal swabs were cultured on reptile cells (TH1-cells) and examined more closely with an electron microscope for the detection of herpesvirus. Blood plasma samples were tested for antibodies against *Mycoplasma agassizii* with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and for neutralising antibodies against herpesvirus by neutralization test with three different isolates.

Striking differences in the results regarding species and status (free-ranging or captive) of the tortoises were found in almost all tests. 36 animals (10,9 %) showed clinical signs of stomatitis and/or rhinitis. Of the tortoises in captivity, TGG (39,4 %) and TGI (9,7 %) appeared most prone to showing clinical signs.

Using culture and PCR, 8 nasal samples (2,4 %) were positive for the presence of mycoplasma. All of these positive animals were *Testudo graeca*. By means of



restriction enzyme analysis of the amplification products from the 16S-rRNA-gene, these *Mycoplasma*-isolates were identified as *Mycoplasma agassizii*. In 5 isolates the band pattern could not be distinguished from the *Mycoplasma agassizii* reference strain PS6. Three isolates showed an additional *Sau96* I-digestion site, which is due to a thus far unknown point mutation in position 802 (deletion of adenosin in the three differing isolates).

102 (31 %) of the tested tortoises were positive for antibodies against *Mycoplasma agassizii*. 29 free-ranging (21,8 %) and 73 captive animals tested positive. Results indicated that more *Testudo graeca* were positive than *Testudo hermanni*. Within the group of animals in captivity, TGI were the animals with the highest percentage of positive results. Free-living tortoises had significantly lower average mycoplasma-ELISA-values than animals in captivity ( $p < 0,0005$ ). TGG achieved higher levels than THH in both the free-living and captive groups. TGI reached levels that were almost as high as TGG.

A cytopathogenic virus was isolated from the pharyngeal and cloacal swab of only one tortoise, a female TGI, with a stomatitis and rhinitis. The virus could be cultured from the pharyngeal as well as the cloacal swab. Using a neutralization test (NT), 39 animals (11,9 %) tested positive for antibodies against at least two of the herpesvirus isolates tested. Only captive TGG and TGI, but no captive THH or free-ranging tortoises were positive in the herpesvirus-NT. TGI in captivity tested positive more often than TGG, but both subspecies had comparable titers.

Statistical analysis of the results often showed significant correlation between the analysed parameters. Diseases of the upper respiratory and the digestive tract were positively correlated with isolation of mycoplasma ( $p < 0,001$ ). A positive correlation was also proven for the presence of the above mentioned symptoms and antibodies against mycoplasma ( $p < 0,0005$ ) and herpesvirus ( $p = 0,041$ ). Results of the mycoplasma ELISA and culture for mycoplasma showed highly significant correlation ( $p < 0,0005$ ) as did mycoplasma-PCR and herpesvirus-NT ( $p = 0,001$ ). Furthermore, a significant correlation between the presence of antibodies against mycoplasma and herpesvirus was noted during this study ( $p < 0,0005$ ).

The differences among species found regarding incidence of clinical symptoms, and the results of the tests for mycoplasma and herpesvirus (TG>TH) lead to the conclusion that close contact between *Testudo graeca* and *Testudo hermanni* should be avoided. As all serologic positive tortoises must be considered latent carriers and are a potential threat for other tortoises, all new introductions in tortoise collections should be treated as possible latent carriers. Thus, preventive measures such as sufficient quarantine, thorough clinical examination and repeated testing for herpesvirus and mycoplasma should be carried out on all new animals. Tortoises that have lived in captivity and are released into the wild are potential carriers of pathogens such as herpesvirus and mycoplasma. They may spread these pathogens and are of high potential risk especially for naive tortoises in free-ranging populations.

## 8 Literaturverzeichnis

ADAMS, H. P., BROWN, M. B. und JACOBSON, E. R. (1996):

Tortoise tracheal explant studies on isolates of *Mycoplasma agassizii* fail to demonstrate cytopathic effects.

International Congress of the Organization for Mycoplasmaology, Orlando, Florida, USA, Vol. 4, p. 97.

ADAMS, H. P. und JACOBSON, E. R. (1995):

Upper respiratory tract disease in the desert tortoise, *Gopherus agassizii*.

Proceedings Comptes Rendus du Cinquième Colloque international de Pathologie des Reptiles et des Amphibiens, Alphen aan den Rijn, Holland, p. 11.

ADNYANA, W., LADDS, P. W. und BLAIR, D. (1997):

Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia.

Australian Veterinary Journal **75**:10, 736-742.

AGUIRRE, A. A., BALAZS, G. H., SPRAKER, T. R. und GROSS, T. S. (1995):

Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas.

Physiological Zoology **68**:5, 831-854.

AHNE, W. (1992):

Viruses of chelonia.

Proceedings 1<sup>st</sup> International Congress of Chelonian Pathology, Gonfaron, France, pp. 57-78.

---

AHNE, W. (1993):

Viruses of chelonia.

Zentralbl Veterinarmed B **40**:1, 35-45.

AMBROSIUS, H. (1976):

Immunoglobulins and antibody production in reptiles. In: Comparative Immunology. Marchalonis (ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain, pp. 298-334.

AUSTWICK, P. K. und KEYMER, I. F. (1981):

Fungi and Actinomycetes. In: Diseases of Reptilia. Cooper, J. E. und O. F. Jackson (eds.). Academic Press, London, Great Britain, pp. 193-221.

BIERMANN, R. (1995):

Isolierung und Charakterisierung von Herpesviren bei Landschildkröten.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland, p. 71.

BIERMANN, R. und BLAHAK, S. (1993):

First isolation of herpesvirus from tortoises with diphtheroid-necrotizing stomatitis.

Proceedings 2<sup>nd</sup> World Congress of Herpetology, Adelaide, Australia, p. 27.

BLAHAK, S. (1994):

Untersuchungen zum Vorkommen von Paramyxoviren bei Schlangen und Charakterisierung ausgewählter Isolate.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland, p. 147.

BLAHAK, S. (2000a):

Infektionskrankheiten der Reptilien unter besonderer Berücksichtigung der Zoonosen - Ein Überblick für die Praxis.

Der Praktische Tierarzt **81**:2, 113-126.

BLAHAK, S. (2000b):

Virusinfektionen bei Reptilien.  
Der Praktische Tierarzt **81**:2, 92-112.

BLAHAK, S. und BIERMANN, R. (1995):

Herpesvirus infection in land tortoises as a problem of chelonian conservation.  
Proceedings International Congress of Chelonian Conservation, Gonfaron, France, pp. 240-243.

BONIN, F. (1992):

Parasites of the digestive tract in *Testudo graeca* (relation to the "runny nose syndrom").  
Proceedings 1<sup>st</sup> International Congress of Chelonian Pathology, Gonfaron, France, pp. 110-120.

BOYER, T. H. (1995):

Clinical reptilian microbiology. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice. Twelfth Edition, Kirk, R. W. und J. D. Bonagura (eds.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 1353-1361.

BRAUNE, S., GEISS, V. und THIEL, W. (1989):

Eine neue durch Herpesviren verursachte Erkrankung bei Landschildkröten.  
Tierärztliche Praxis **17**:4, 416-419.

BROOKS, D. E., GINN, P. E., MILLER, T. R., BRAMSON, L. und JACOBSON, E. R. (1994):

Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*).  
Veterinary Pathology **31**:3, 335-339.

BROWN, D. R. (2002):

Mycoplasmosis and immunity of fish and reptiles.  
Frontiers in Bioscience **7**, D1338-1346.

BROWN, D. R., BROWN, M. B. und TULLY, J. G. (1997):

Comparison of mycoplasma isolated from alligators and crocodiles. Washington, D.C., USA, American Society for Microbiology, p. 281.

BROWN, D. R., CLIPPINGER, T. L., HELMICK, K. E., SCHUMACHER, I. M., BENNETT, R. A., JOHNSON, C. M., VLIET, K. A., JACOBSON, E. R. und BROWN, M. B. (1996):

Mycoplasma isolation during a fatal epizootic of captive alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida.  
International Congress of the Organization for Mycoplasmaology, Orlando, Florida, USA, Vol. 4, pp. 42-43.

BROWN, D. R., CRENSHAW, B. C., MCLAUGHLIN, G. S., SCHUMACHER, I. M., MCKENNA, C. E., KLEIN, P. A., JACOBSON, E. R. und BROWN, M. B. (1995):

Taxonomic analysis of the tortoise mycoplasmas *Mycoplasma agassizii* and *Mycoplasma testudinis* by 16S rRNA gene sequence comparison.  
International Journal of Systematic Bacteriology **45**:2, 348-350.

BROWN, D. R., FARLEY, J. M., ZACHER, L. A., CARLTON, J. M., CLIPPINGER, T. L., TULLY, J. G. und BROWN, M. B. (2001a):

*Mycoplasma alligatoris* sp. nov., from American alligators.  
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**:Pt 2, 419-424.

BROWN, D. R., LACKOVICH, J. K. und KLEIN, P. A. (1999a):

Further evidence for the absence of papillomaviruse from sea turtle fibropapillomas.  
The Veterinary Record **145**, 616-617.

BROWN, D. R., MATHES, K. A., TULLY, J. G. und BROWN, M. B. (1998):

A 16S rRNA gene RFLP of *Mycoplasma agassizii* (proposed sp. nov.).  
International Congress of the Organization for Mycoplasmaology, Atlanta,  
USA, Vol. 5, pp. 147-148.

BROWN, D. R., NOGUEIRA, M. F., SCHOEB, T. R., VLIET, K. A., BENNETT,  
R. A., PYE, G. W. und JACOBSON, E. R. (2001b):

Pathology of experimental mycoplasmosis in American alligators.  
*Journal of Wildlife Diseases* **37**:4, 671-679.

BROWN, M. B., BERRY, K. H., SCHUMACHER, I. M., NAGY, K. A.,  
CHRISTOPHER, M. M. und KLEIN, P. A. (1999b):

Seroepidemiology of upper respiratory tract disease in the desert tortoise  
in the western Mojave Desert of California.  
*Journal of Wildlife Diseases* **35**:4, 716-727.

BROWN, M. B., BROWN, D. R., KLEIN, P. A., MCLAUGHLIN, G. S.,  
SCHUMACHER, I. M., JACOBSON, E. R., ADAMS, H. P. und TULLY, J. G.  
(2001c):

*Mycoplasma agassizii* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract  
of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) and the gopher tortoise  
(*Gopherus polyphemus*).  
*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:Pt  
2, 413-418.

BROWN, M. B., FÜRST, I. M., PATHANGEY, A. und JACOBSON, E. R. (1992):

Upper respiratory tract disease in the desert tortoise.  
International Congress of the Organization for Mycoplasmaology, p. 189.

BROWN, M. B., MCLAUGHLIN, G. S., KLEIN, P. A., CRENSHAW, B. C.,  
SCHUMACHER, I. M., BROWN, D. R. und JACOBSON, E. R. (1999c):

Upper respiratory tract disease in the gopher tortoise is caused by  
*Mycoplasma agassizii*.  
*Journal of Clinical Microbiology* **37**:7, 2262-2269.

BROWN, M. B., SCHUMACHER, I. M., KLEIN, P. A., HARRIS, K., CORRELL, T. und JACOBSON, E. R. (1994):

*Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise.

Infection and Immunity **62**:10, 4580-4586.

CARPENTER, J. W., MASHIMA, T. Y. und RUPPER, D. J. (2001):

Reptiles. In: Exotic Animal Formulary. Second Edition, W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 39-105.

CASEY, R. N., QUACKENBUSH, S. L., WORK, T. M., BALAZS, G. H., BOWSER, P. R. und CASEY, J. W. (1997):

Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian islands.

Diseases of Aquatic Organisms **31**, 1-7.

CAVALLI-SFORZA, L. (1964):

Kapitel 3: Mittelwerte und Variabilität. In: Grundbegriffe der Biometrie insbesondere der statistischen Methoden bei der Wertbemessung biologisch wichtiger Substanzen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 31-53.

CHEN, Z. X., ZHENG, J. C. und JIANG, Y. L. (1999):

A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle.

Virus Research **63**:1-2, 147-151.

CHEVILLE, N. F. (1994):

Family *herpesviridae* (Cytopathology of intracellular infection). In: Ultrastructural pathology: an introduction to interpretation. Cheville, N. F. (ed.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 502-514.



CHEYLAN, M. (1981):

Biologie et Ecologie de la tortue d'Hermann *Testudo hermanni* GMEHLIN, 1789. Contribution de l'espèce à la connaissance des climats quaternaires de la France.

Biologie Diss., Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, p. 404.

CLARK, H. F. und KARZON, D. T. (1981):

Viruses of reptiles. In: Diseases of the Reptilia. Volume I. Cooper, J. E. und O. F. Jackson (eds.). Academic Press, New York, USA, pp. 135-164.

CLIPPINGER, T. L., BENNETT, R. A., JOHNSON, C. M., VLIET, K. A., DEEM, S. L., OROS, J., JACOBSON, E. R., SCHUMACHER, I. M., BROWN, D. R. und BROWN, M. B. (2000):

Morbidity and mortality associated with a new mycoplasma species from captive American alligators (*Alligator mississippiensis*).

Journal of Zoo and Wildlife Medicine **31**:3, 303-314.

CLIPPINGER, T. L., BENNETT, R. A., JOHNSON, C. M., VLIET, K. A., JACOBSON, E. R., BROWN, D. R. und BROWN, M. B. (1996):

Mycoplasma epizootic in a herd of Bull alligators (*Alligator mississippiensis*).

Proceedings Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), pp. 230-234.

COBERLEY, S. S., HERBST, L. H., BROWN, D. R., EHRHART, L. M., BAGLEY, D. A., SCHAF, S. A., MORETTI, R. H., JACOBSON, E. R. und KLEIN, P. A. (2001a):

Detection of antibodies to a disease-associated herpesvirus of the green turtle, *Chelonia mydas*.

Journal of Clinical Microbiology **39**:10, 3572-3577.

---

COBERLEY, S. S., HERBST, L. H., EHRHART, L. M., BAGLEY, D. A., HIRAMA, S., JACOBSON, E. R. und KLEIN, P. A. (2001b):

Survey of Florida green turtles for exposure to a disease-associated herpesvirus.

Diseases of Aquatic Organisms **47**:3, 159-167.

COOPER, J. E., GSCHMEISSNER, S. und BONE, R. D. (1988):

Herpes-like virus particles in necrotic stomatitis of tortoises.

The Veterinary Record **123**:21, 544.

COOPER, J. E. und SAINSBURY, A. W. (1994):

Review: Oral diseases of reptiles.

Herpetological Journal **4**, 117-125.

COX, W. R., RAPLEY, W. A. und BARKER, I. K. (1980):

Herpesvirus-like infection in a painted turtle (*Chrysemys picta*).

Journal of Wildlife Diseases **16**:3, 445-449.

CURRY, S. S., BROWN, D. R., GASKIN, J. M., JACOBSON, E. R., EHRHART, L. M., BLAHAK, S., HERBST, L. H. und KLEIN, P. A. (2000):

Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtles after exposure to seawater.

Journal of Wildlife Diseases **36**:4, 792-797.

DICKINSON, V. M., DUCK, T., SCHWALBE, C. R., JARCHOW, J. L. und TRUEBLOOD, M. H. (2001):

Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the western United States.

Journal of Wildlife Diseases **37**:2, 252-257.

DRURY, S. E., GOUGH, R. E., MCARTHUR, S. und JESSOP, M. (1998):

Detection of herpesvirus-like and papillomavirus-like particles associated with diseases of tortoises.

The Veterinary Record **143**:23, 639.

DRURY, S. E., GOUGH, R. E., KAY, A. V. und MCARTHUR, S. D. (1999a):

Detection and isolation of a herpesvirus from a spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) in the UK.

The Veterinary Record **145**:20, 586-588.

DRURY, S. E., MCARTHUR, S. und GOUGH, R. E. (1999b):

Isolation and identification of herpesvirus and papillomavirus from tortoises in Great Britain.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Columbus, Ohio, USA, pp. 69-75.

EGGENSCHWILER, U. (2000):

Die Schildkröte in der Tierärztlichen Praxis.

Schöneck Verlag, Siblingen, Schweiz, p. 162.

ELLISON, J. S., OLSON, L. D. und BARILE, M. F. (1992):

Immunity and vaccine development. In: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Maniloff, J., R. McElhaney, L. R. Finch, und J. B. Baseman (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, pp. 491-499.

EVANS, R. H. (1983):

Chronic bacterial pneumonia in free-ranging Eastern box turtles  
(*Terrapene carolina carolina*).

Journal of Wildlife Diseases **19**:4, 349-352.

FERTARD, B. (1987):

Pathologie respiratoire des serpents.

Elapsoïdea **1**:Juin, 3-12.

FORSYTH, M. H., TULLY, J. G., GORTON, T. S., HINCKLEY, L., FRASCA, S.,  
JR., VAN KRUININGEN, H. J. und GEARY, S. J. (1996):

*Mycoplasma sturni* sp. nov., from the conjunctiva of a European starling  
(*Sturnus vulgaris*).

International Journal of Systematic Bacteriology **46**:3, 716-719.

FOWLER, M. E. (1977a):

Respiratory disease in captive tortoises.

Proceedings of the Desert Tortoise Council Symposium, Palm Desert,  
California, USA, pp. 89-98.

FOWLER, M. E. (1977b):

Respiratory disease in desert tortoises.

Proceedings of American Association of Zoo Animal Veterinarians, pp.  
96-97.

FOWLER, M. F. (1980a):

Comparison of respiratory infection and hypovitaminosis A in desert  
tortoises. In: The Comparative Pathology of Zoo Animals. Montali, R. J.  
und G. Migaki (eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.,  
USA, pp. 93-98.

FOWLER, M. F. (1980b):

Respiratory disease in reptiles. In: Current Veterinary Therapy VII. Small Animal Practice. Seventh Edition, Kirk, R. W. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 633-637.

FRANK, W. (1985a):

Amphibien und Reptilien (Infektions- und Invasionskrankheiten). In: Heimtierkrankheiten. Isenbügel, E. und W. Frank (eds.). Ullmer Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 195-320.

FRANK, W. (1985b):

Amphibien und Reptilien (Nichtinfektiöse Erkrankungen). In: Heimtierkrankheiten. Isenbügel, E. und W. Frank (eds.). Ullmer Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 321-367.

FREUNDT, E. A. (1985):

Host-parasite relationships of mycoplasmas. In: Infektionen durch Mycoplasmatales. 1. Auflage, Gylstorff, I., W. Köhler, A. Mayr, und M. Truszczyński (eds.). Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 58-87.

FROST, J. W. und SCHMIDT, A. (1997):

Serological evidence for susceptibility of various tortoise species to herpesvirus infection.

Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, Schweiz, 38, pp. 25-28.

FRYE, F. L. (1977):

Bacterial and fungal diseases of captive reptiles. In: Current Veterinary Therapy VI. Small Animal Practice. Sixth Edition, Kirk, R. W. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 787-791.

FRYE, F. L. (1989):

Vitamin A sources, hypovitaminosis A and iatrogenic hypervitaminosis A in captive chelonians. In: Current Veterinary Therapy X. Small Animal Practice. Tenth Edition, Kirk, R. W. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 791-796.

FRYE, F. L. (1991):

Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry.

Frye, F. L. (ed.). Second Edition, Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, USA, Volume I, pp. 1-325.

FRYE, F. L. (1995):

Reptile clinicians handbook - a compact clinical and surgical reference.

Second Edition, Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, USA, p. 276.

FRYE, F. L., OSHIRO, L. S., DUTRA, F. R. und CARNEY, J. D. (1977):

Herpesvirus-like infection in two Pacific pond turtles.

Journal of the American Veterinary Medical Association **171**:9, 882-884.

GABRISCH, K. und ZWART, P. (2001):

Krankheiten der Schildkröten. In: Krankheiten der Heimtiere. 5. Auflage, Gabrisch, K. und P. Zwart (eds.). Schlütersche Verlag, Hannover, Deutschland, pp. 663-750.

GEDEK, B. (1993):

Spezielle Bakteriologie und Mykologie. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Auflage, Rolle, M. und A. Mayr (eds.). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 536-810.

GLAZEBROOK, J. S., CAMPBELL, R. S. und THOMAS, A. T. (1993):

Studies on an ulcerative stomatitis-obstructive rhinitis-pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta Caretta*.

Diseases of Aquatic Organisms **16**, 133-147.

GOLDBERG, D. R., SAMUEL, M. D., THOMAS, C. B., SHARP, P., KRAPU, G. L., ROBB, J. R., KENOW, K. P., KORSCHGEN, C. E., CHIPLEY, W. H., CONROY, M. J. und ET AL. (1995):

The occurrence of mycoplasmas in selected wild North American waterfowl.

Journal of Wildlife Diseases **31**:3, 364-371.

GYLSTORFF, I. (1985):

Pathomorphologie der Mycoplasmatales-Infektionen bei Vertebraten. In: Infektionen durch Mycoplasmatales. 1. Auflage, Gylstorff, I., W. Köhler, A. Mayr, und M. Truszczyński (eds.). Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 167-209.

HÄFELI, W. und SCHILDGER, B. J. (1995):

Reptilien. In: Krankheiten der Zoo- und Wildtiere. Göldenboth, R. und H. G. Klös (eds.). Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, Deutschland, pp. 530-554.

HAINES, H. und KLEESE, W. C. (1977):

Effect of water temperature on a herpesvirus infection of sea turtles.

Infection and Immunity **15**:3, 756-759.

HARPER, P. A., HAMMOND, D. C. und HEUSCHELE, W. P. (1982):

A herpesvirus-like agent associated with a pharyngeal abscess in a desert tortoise.

Journal of Wildlife Diseases **18**:4, 491-494.

HARTUP, B. K., DHONDT, A. A., SYDENSTRICKER, K. V., HOCHACHKA, W. M. und KOLLIAS, G. V. (2001):

Host range and dynamics of mycoplasmal conjunctivitis among birds in North America.

Journal of Wildlife Diseases **37**:1, 72-81.

HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1982):

Spontaneous viral hepatitis in a spur-tailed Mediterranean land tortoises (*Testudo hermanni*).

Journal of Zoo Animal Medicine **13**, 113-120.

HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1984):

Virus-associated gastrointestinal diseases in snakes.

Journal of Zoo Animal Medicine **15**, 118-128.

HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1989):

*Herpesviridae* causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoises (*Testudo hermanni*).

Herpetopathologia **1**:2, 5-9.

HELMICK, K. E., PAPICH, M. P., VLIET, K. A., BENNETT, R. A., BROWN, M. B. und JACOBSON, E. R. (1997):

Preliminary kinetics of single-dose intravenously administered enrofloxacin and oxytetracycline in the American alligator (*Alligator mississippiensis*).

Proceedings Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), Houston, Texas, USA, pp. 27-28.

HERBST, L. H. (1994):

Fibropapillomatosis of marine turtles.

Annual Review of Fish Diseases **4**, 389-425.



HERBST, L. H., GREINER, E. C., EHRHART, L. M., BAGLEY, D. A. und KLEIN, P. A. (1998):

Serological association between spirorchidiasis, herpesvirus infection, and fibropapillomatosis in green turtles from Florida.

Journal of Wildlife Diseases **34**:3, 496-507.

HERBST, L. H., JACOBSON, E. R. und KLEIN, P. A. (1995a):

Green turtle fibropapillomatosis: evidence for a viral etiology.

Proceedings Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), East Lansing, Michigan, USA, p. 224.

HERBST, L. H., JACOBSON, E. R., MORETTI, R., BROWN, T., SUNDBERG, J. P. und KLEIN, P. A. (1995b):

Experimental transmission of green turtle fibropapillomas using cell-free tumor extract.

Diseases of Aquatic Organisms **22**:1, 1-12.

HERBST, L. H. und KLEIN, P. A. (1995):

Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors.

Environmental Health Perspective **103**:Suppl 4, 27-30.

HERBST, L. H., MORETTI, R., BROWN, T. und KLEIN, P. A. (1996):

Sensitivity of the transmissible green turtle fibropapillomatosis agent to chloroform and ultracentrifugation conditions.

Diseases of Aquatic Organisms **25**, 225-228.

HERVAS, J., SANCHEZ-CORDON, P. J., DE CHACON LARA, F., CARRASCO, L. und GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C. (2002):

Hepatitis associated with herpes viral infection in the tortoise (*Testudo horsfieldii*).

Journal of Veterinary Medicine B **49**:2, 111-114.

HIERHOLZER, J. C. und KILLINGTON, R. A. (1996):

Virus isolation and quantitation. In: Virology Methods Manual. Mahy, B. W. J. und H. O. Kangro (eds.). Hartcourt Brace and Company, London, Great Britain, pp. 25-46.

HILL, A. C. (1985):

*Mycoplasma testudinis*, a new species isolated from a tortoise.  
International Journal of Systematic Bacteriology **35**:4, 489-492.

HOFF, G. L. und HOFF, D. M. (1984):

Herpesviruses of reptiles. In: Diseases of Amphibians and Reptiles. Hoff, G. L., F. L. Frye, und E. R. Jacobson (eds.). Plenum Press, New York, USA, pp. 159-167.

HOLT, P. E. und COOPER, J. E. (1976):

Stomatitis in the Greek tortoise (*Testudo graeca*).  
The Veterinary Record **98**:8, 156.

HOMER, B. L., BERRY, K. H., BROWN, M. B., ELLIS, G. und JACOBSON, E. R. (1998):

Pathology of diseases in wild desert tortoises from California.  
Journal of Wildlife Diseases **34**:3, 508-523.

HUNT, T. J. (1957):

Notes on mortality in testudines.  
Herpetologica **13**, 19-23.

JACKSON, O. F. und NEEDHAM, J. R. (1983):

Rhinitis and virus antibody titres in chelonians.  
Journal of Small Animal Practice **24**, 31-36.

JACOBSON, E. R. (1980):

Infectious diseases of reptiles. In: Current Veterinary Therapy VII. Small Animal Practice. Seventh Edition, Kirk, R. W. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 625-633.

JACOBSON, E. R. (1981):

Neoplastic diseases. In: Diseases of Reptilia. Cooper, J. E. und O. F. Jackson (eds.). Academic Press, London, Great Britain, pp. 429-468.

JACOBSON, E. R. (1983):

Parasitic diseases of reptiles. In: Current Veterinary Therapy VIII. Small Animal Practice. Eighth Edition, Kirk, R. W. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 599-606.

JACOBSON, E. R. (1991):

Chronic upper respiratory tract disease.

Proceedings 4<sup>th</sup> International Colloquium on Pathology and Medicine of Reptiles and Amphibians, Bad Nauheim, Deutschland.

JACOBSON, E. R. (1992):

Special report: The desert tortoise and upper respiratory tract disease. Riverside, California, USA, November 1992, Report to the U.S. Bureau of Land Management, California Desert District and The Desert tortoise Preserve Committee, pp. 1-4.

JACOBSON, E. R. (1993):

Viral diseases in reptiles (Amphibians and reptiles). In: Zoo & Wild Animal Medicine. Third Edition, Fowler, M. E. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 153-159.

JACOBSON, E. R. (1994):

Causes of mortality and diseases in tortoises: a review.  
Journal of Zoo and Wildlife Medicine **25**:1, 2-17.

JACOBSON, E. R. (1996):

Metabolic scaling of antibiotics in reptiles: Basis and limitations.  
Zoo Biology **15**, 329-339.

JACOBSON, E. R. (1997):

Diseases of the respiratory tract of chelonians.  
Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die  
Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, Schweiz, 38, pp. 1-5.

JACOBSON, E. R. (1999):

Antimicrobial therapy in reptiles. In: Antimicrobial Therapy in  
Exotics. Leverkusen, Deutschland, Supplement to Compendium on  
Continuing Education for the Practicing Veterinarian. Selected papers  
from the 1999 North American Veterinary Conference., pp. 33-48.

JACOBSON, E. R., BROWN, D. R., SCHUMACHER, I. M., MCLAUGHLIN, G.  
S., BROWN, M. B. und KLEIN, P. A. (1995):

Mycoplasmosis and the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in Las  
Vegas Valley, Nevada.  
Chelonian Conservation and Biology **1**:4, 280-284.

JACOBSON, E. R., BROWN, D. R., SCHUMACHER, I. M., MCLAUGHLIN, G.  
S., BROWN, M. B. und KLEIN, P. A. (2003 - in press):

Development and application of diagnostic tests for mycoplasmal  
infections of tortoises.  
Chelonian Conservation and Biology **4**:2.

JACOBSON, E. R., BUERGELT, C., WILLIAMS, B. und HARRIS, R. K. (1991a):

Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia  
mydas*.  
Diseases of Aquatic Organisms **12**, 1-6.

JACOBSON, E. R., CLUBB, S., GASKIN, J. M. und GARDINER, C. (1985):

Herpesvirus-like infection in Argentine tortoises.

Journal of the American Veterinary Medical Association **187**:11, 1227-1229.

JACOBSON, E. R. und GASKIN, J. M. (1990):

Clinicopathologic investigations on an upper respiratory disease of free-ranging desert tortoises, *Xerobates agassizii*.

Proceedings First International Symposium on Turtles and Tortoises: Conservation and Captive Husbandry, Chapman University, USA, p. 107.

JACOBSON, E. R., GASKIN, J. M., BROWN, M. B., HARRIS, R. K., GARDINER, C. H., LAPOINTE, J. L., ADAMS, H. P. und REGGIARDO, C. (1991b):

Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*).

Journal of Wildlife Diseases **27**:2, 296-316.

JACOBSON, E. R., GASKIN, J. M., ROELKE, M., GREINER, E. C. und ALLEN, J. (1986):

Conjunctivitis, tracheitis, and pneumonia associated with herpesvirus infection in green sea turtles.

Journal of the American Veterinary Medical Association **189**:9, 1020-1023.

JACOBSON, E. R., GASKIN, J. M. und WAHLQUIST, H. (1982):

Herpesvirus-like infection in map turtles.

Journal of the American Veterinary Medical Association **181**:11, 1322-1324.

JACOBSON, E. R., MANSELL, J. L., SUNDBERG, J. P., HAJJAR, L., REICHMANN, M. E., EHRHART, L. M., WALSH, M. und MURRU, F. (1989):

Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*).  
Journal of Comparative Pathology **101**:1, 39-52.

JACOBSON, E. R., SCHUMACHER, J., TELFORD, S. R., JR., GREINER, E. C., BUERGELT, C. und GARDINER, C. H. (1994):

Intranuclear coccidiosis in radiated tortoises (*Geochelone radiata*).  
Journal of Zoo and Wildlife Medicine **25**, 95-122.

JANG, S. S. und BIBERSTEIN, E. L. (1991):

Observations on the occurrence of *Pasteurella testudinis* in clinical specimens from animals.  
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **3**:2, 174-176.

JENKINS, J. R. (1997):

Medical management of reptile patients. The Compendium Collection. In: Practical Exotic Animal Medicine. Rosenthal, K. L. (ed.). Veterinary Learning Systems Co., Trenton, New Jersey, USA, pp. 7-13.

JUNGE, R. E. und MILLER, R. E. (1992):

Reptile respiratory diseases. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XI. Small Animal Practice. Eleventh Edition, Kirk, R. W. und J. D. Bonagura (eds.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 1204-1210.

KAADEN, O.-R. (2002):

Viruskrankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage, Rolle, M. und A. Mayr (eds.). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 145-415.

KABISCH, D. und FROST, J. W. (1994):

Isolation of herpesvirus from *Testudo hermanni* and *Agrionemys horsfieldii*.

Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, 36, pp. 241-245.

KALETA, E. F. (2003):

Persönliche Mitteilung. Gießen, Deutschland

KENNY, G. E. (1992):

Serodiagnosis. In: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Maniloff, J., R. McElhaney, L. R. Finch, und J. B. Baseman (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, pp. 505-511.

KIRCHHOFF, H., MOHAN, K., SCHMIDT, R., RUNGE, M., BROWN, D. R., BROWN, M. B., FOGGIN, C. M., MUVAVARIRWA, P., LEHMANN, H. und FLOSSDORF, J. (1997):

*Mycoplasma crocodyli* sp. nov., a new species from crocodiles.

International Journal of Systematic Bacteriology **47**:3, 742-746.

KLEVEN, S. H. (1997):

*Mycoplasma synoviae* infection. In: *Diseases of poultry*. Calnek, B. W., H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, und Y. M. Saif (eds.). Mosby-Wolfe, Ames, Iowa, USA, pp. 220-228.

KLINGENBERG, R. J. (1996):

Therapeutics (Special techniques and procedures). In: *Reptile Medicine and Surgery*. Mader, D. R. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, pp. 299-321.

KÖHLER, G. (1996):

Spezielle Krankheiten der Reptilien-Schildkröten. In: Krankheiten der Reptilien und Amphibien. Köhler, G. (ed.). Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 100-111.

KOMENT, R. W. und HAINES, H. (1977):

A new reptilian herpesvirus isolated from the Green Sea Turtle, *Chelonia mydas*.

Abstracts Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 18, p. 347.

KRAUSE, D. C. und TAYLOR-ROBINSON, D. (1992):

Mycoplasma which infect humans. In: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Maniloff, J., R. McElhaney, L. R. Finch, und J. B. Baseman (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, pp. 417-436.

KROKER, R., SCHERKL, R. und UNGEMACH, F. R. (2002):

Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 2. Auflage, Frey, H.-H. und W. Löscher (eds.). Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 353-393.

KÜBBER-HEISS, A., SCHILCHER, F. und MÖSTL, K. (1999):

Herpesvirusinfektionen bei Landschildkröten in Österreich.

Wiener Tierärztliche Monatsschrift **86**, 78-82.

LACKOVICH, J. K., BROWN, D. R., HOMER, B. L., GARBER, R. L., MADER, D. R., MORETTI, R. H., PATTERSON, A. D., HERBST, L. H., OROS, J., JACOBSON, E. R., CURRY, S. S. und KLEIN, P. A. (1999):

Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida.

Diseases of Aquatic Organisms **37**:2, 89-97.



LANE, T. J. und MADER, D. R. (1996):

Parasitology. In: Reptile Medicine and Surgery. Mader, D. R. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, pp. 185-203.

LANGE, H., HERBST, W., WIECHERT, J. M. und SCHLIESSER, T. (1989):

Elektronenmikroskopischer Nachweis von Herpesviren bei einem Massensterben von Griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*) und Vierzehenschildkröten (*Agrionemys horsfieldii*).

Tierärztliche Praxis **17**:3, 319-321.

LAWRENCE, K. und NEEDHAM, J. R. (1985):

Rhinitis in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*).

The Veterinary Record **117**:25-26, 662-664.

LEDERLE, P. E., RAUTENSTRAUCH, K. R., RAKESTRAW, D. L., ZANDER, K. K. und BOONE, J. L. (1997):

Upper respiratory tract disease and mycoplasmosis in desert tortoises from Nevada.

Journal of Wildlife Diseases **33**:4, 759-765.

LEY, D. H., BERKHOFF, J. E. und MCLAREN, J. M. (1996):

*Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis.

Avian Diseases **40**:2, 480-483.

LU, Y., WANG, Y., YU, Q., AGUIRRE, A. A., BALAZS, G. H., NERURKAR, V. R. und YANAGIHARA, R. (2000):

Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction.

Archives of Virology **145**:9, 1885-1893.

LUTZ, C. S. I. (1997):

Beitrag zur historischen Entwicklung des Handelspräparates Tylosin (Tylan<sup>®</sup>) und seiner Derivate von 1955-1997 sowie dessen weltweiter Einsatz bei der Bekämpfung aviärer Mykoplasmosen.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland, p. 334.

MADER, D. R. (1996):

Upper alimentary tract disease (Specific diseases and conditions). In: Reptile Medicine and Surgery. Mader, D. R. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, pp. 421-424.

MADER, D. R. (1998):

Antimicrobial therapy in reptiles. In: Antimicrobial Therapy in Exotics. Leverkusen, Deutschland, Supplement to Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. Selected papers from the 1997 and 1998 North American Veterinary Conference., pp. 23-33.

MANSELL, J. L., JACOBSON, E. R. und GASKIN, J. M. (1989):

Initiation and ultrastructure of a reptilian fibroblast cell line obtained from cutaneous fibropapillomas of the green turtle, *Chelonia mydas*.

In Vitro Cellular and Developmental Biology **25**:11, 1062-1064.

MARCUS, L. C. (1977):

Parasitic diseases of captive reptiles. In: Current Veterinary Therapy VI. Small Animal Practice. Sixth Edition, Kirk, R. W. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 801-806.

MARSCHANG, R. E. (1999a):

Evidence for a new herpesvirus serotype associated with stomatitis in Afghan tortoises (*Testudo horsfieldii*).

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Columbus, Ohio, USA, pp. 77-79.

MARSCHANG, R. E. (1999b):

Isolierung und Charakterisierung von Irido-, Herpes- und Reoviren aus Landschildkröten sowie Beschreibung eines nicht charakterisierten zytopathogenen Agens.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland, p. 155.

MARSCHANG, R. E., BECHER, P., POSTHAUS, H., WILD, P., THIEL, H. J., MULLER-DOBLIES, U., KALETA, E. F. und BACCIARINI, L. N. (1999):

Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*).

Archives of Virology **144**:10, 1909-1922.

MARSCHANG, R. E., FROST, J. W., GRAVENDYCK, M. und KALETA, E. F. (2001a):

Comparison of 16 chelonid herpesviruses by virus neutralization tests and restriction endonuclease digestion of viral DNA.

Journal of Veterinary Medicine B **48**:5, 393-399.

MARSCHANG, R. E., GRAVENDYCK, M. und KALETA, E. F. (1997a):

Herpesviruses in tortoises: investigations into virus isolation and the treatment of viral stomatitis in *Testudo hermanni* and *T. graeca*.

Journal of Veterinary Medicine B **44**:7, 385-394.

MARSCHANG, R. E., GRAVENDYCK, M. und KALETA, E. F. (1997b):

New investigations on herpesviruses in tortoises.

Verhandlungsbericht des 38. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, Schweiz, pp. 29-34.

MARSCHANG, R. E., MILDE, K. und BELLAVISTA, M. (2001b):

Virus isolation and vaccination of Mediterranean tortoises against a chelonid herpesvirus in a chronically infected population in Italy.

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **108**:9, 376-379.

MARSCHANG, R. E., POSTHAUS, H., GRAVENDYCK, M., KALETA, E. F. und BACCIARINI, L. N. (1998):

Isolation of viruses from land tortoises in Switzerland.

Proceedings Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV) and the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Omaha, Nebraska, USA, pp. 281-284.

MARSCHANG, R. E. und RUEMENAPF, T. H. (2002):

Virus "X": Characterizing a new viral pathogen in tortoises.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Reno, Nevada, USA, Vol. 9, pp. 101-102.

MARTÍNEZ SILVESTRE, A., RAMIS, A., MAJÓ, N., SOLER MASSANA, J., MARSCHANG, R. E. und ORIGGI, F. C. (2001):

Viral analysis in a case of chronic rhinitis in a captive spurthighed tortoise (*Testudo graeca*).

[Analyse virale dans un cas de rhinite chronique chez une tortue mauresque (*Testudo graeca*) en captivité].

Proceedings International Congress on *Testudo* Genus, Gonfaron - Hyères, France, Vol. 3, pp. 183-186.

MASOVER, G. K. und HAYFLICK, L. (1985):

Fundamental biology of the class mollicutes. In: Infektionen durch Mycoplasmatales. 1. Auflage, Gylstorff, I., W. Köhler, A. Mayr, und M. Truszczyński (eds.). Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 15-29.

MATUSHIMA, E. R., LONGATTO-FILHO, A., DI LORETTO, C., KANAMURA, C. T., RAMOS, M. C. C., SINHORINI, I. L. und GALLO, B. M. G. (1999):

Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological, ultrastructural and immunohistochemical study in Brazilian specimens.

Verhandlungsbericht des 39. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Wien, Österreich, p. 461.

MAUNG, R. T. (1963):

Immunity in the tortoise *Testudo ibera*.

Journal of Pathology and Bacteriology **85**, 51-67.

MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1974):

Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustitration). In: Virologische Arbeitsmethoden. Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Bibrack, und G. Wittmann (eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 35-39.

MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1977):

Neutralisationstest. In: Virologische Arbeitsmethoden. Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Bibrack, und G. Wittmann (eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 457-534.

MCARTHUR, S. (2001):

Emerging viral-associated diseases of chelonians in the United Kingdom. Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Orlando, Florida, USA, pp. 103-115.

MCLAUGHLIN, G. S. (1997):

Upper respiratory tract disease in gopher tortoises, *Gopherus polyphemus*: Pathology, immune response, transmission, and implications for conservation and management.

PhD thesis, University of Florida, Gainesville, Florida, USA, p. 110.

MCLAUGHLIN, G. S., JACOBSON, E. R., BROWN, D. R., MCKENNA, C. E., SCHUMACHER, I. M., ADAMS, H. P., BROWN, M. B. und KLEIN, P. A. (2000):

Pathology of upper respiratory tract disease of gopher tortoises in Florida.

Journal of Wildlife Diseases **36**:2, 272-283.

MCLAUGHLIN, G. S., SCHUMACHER, I. M., BROWN, D. R., KLEIN, P. A., BROWN, M. B. und JACOBSON, E. R. (1996a):

Upper respiratory tract disease in the Florida gopher tortoise: Dose response study.

International Congress of the Organization for Mycoplasmaology, Orlando, Florida, USA, Vol. 4, p. 56.

MCLAUGHLIN, G. S., SCHUMACHER, I. M., BROWN, D. R., KLEIN, P. A., BROWN, M. B. und JACOBSON, E. R. (1996b):

Upper respiratory tract disease in the Florida gopher tortoise: horizontal and vertical transmission studies.

International Congress of the Organization for Mycoplasmaology, Orlando, Florida, USA, Vol. 4, p. 55.

MIAO, X. S., BALAZS, G. H., MURAKAWA, S. K. und LI, Q. X. (2001):

Congener-specific profile and toxicity assessment of PCBs in green turtles (*Chelonia mydas*) from the Hawaiian Islands.

Science of the Total Environment **281**:1-3, 247-253.

MILLER, R. E. und BREVER, W. J. (1982):

Reptile respiratory diseases.

Norden News **March**, 36-37.

MINSON, A. C., DAVISON, A., EBERLE, R., DESROSIERS, R. C., FLECKENSTEIN, B., MCGEOCH, D. J., PELLET, P. E., ROIZMAN, B. und STUDDERT, D. M. J. (2000):

Family *Herpesviridae*. In: Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, M. K. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, und R. B. Wickner (eds.). Academic Press, San Diego, USA, pp. 203-225.

MOHAN, K., FOGGIN, C. M., MUVAVARIRWA, P. und HONYWILL, J. (1996):

Experimental trial with an alum-precipitated vaccine against mycoplasma in farmed crocodiles (*Crocodylus niloticus*).

International Congress of the Organization for Mycoplasmaology, Orlando, Florida, USA, Vol. 4, p. 287.

MOHAN, K., FOGGIN, C. M., MUVAVARIRWA, P., HONYWILL, J. und PAWANDIWA, A. (1995):

Mycoplasma-associated polyarthritis in farmed crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe.

Onderstepoort Journal of Veterinary Research **62**:1, 45-49.

MÜLLER, M., SACHSSE, W. und ZANGGER, N. (1990):

Herpes-Epidemie bei der Griechischen (*T. hermanni*) und der Maurischen Landschildkröte (*T. graeca*) in der Schweiz.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde **132**:4, 199-203.

MÜLLER, M., ZANGGER, N. und DENSLER, T. (1988):

Iridovirus-Epidemie bei der Griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni hermanni*).

Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Sofia, Bulgarien, Vol. 30, pp. 271-274.

MURO, J., RAMIS, A., PASTOR, J., VELARDE, R., TARRES, J. und LAVIN, S. (1998):

Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain.

Journal of Wildlife Diseases **34**:3, 487-495.

MURPHY, F. A. (1996):

Virus Taxonomy. In: Fields Virology. Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, und S. E. Straus (eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, pp. 15-59.

NIE, Y. C. und LU, C. P. (1999):

Antibody against Testudo herpesvirus is not common in Chinese soft-shelled turtles.

Journal of Veterinary Medicine B **46**:10, 731-734.

OETTLE, E. E., STEYTLER, Y. G. M. und WILLIAMS, M. C. (1990):

High mortality in a tortoise colony.

South African Journal of Wildlife Research **20**:1, 19-25.

OLLENSCHLÄGER, B. (1977):

Immunologie der Reptilien (Krankheitsabwehr). In: Krankheiten der Reptilien. 2. Auflage, Reichenbach-Klinke, H.-H. (ed.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York, pp. 198-203.

ORIGGI, F. C. und JACOBSON, E. R. (1999):

Development of an ELISA and a immunoperoxidase based test or herpesvirus exposure detection in tortoises.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Columbus, Ohio, USA, pp. 65-67.

ORIGGI, F. C. und JACOBSON, E. R. (2000):

Diseases of the respiratory tract of chelonians.

Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice **3**:2, 537-549.

ORIGGI, F. C., JACOBSON, E. R., ROMERO, C. H. und KLEIN, P. A. (2000):

Diagnostic tools for herpesvirus detection in chelonians.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Reno, Nevada, USA, pp. 127-129.



ORIGGI, F. C., JACOBSON, E. R., ROMERO, C. H. und KLEIN, P. A. (2001a):

Tortoise herpesvirus and stomatitis-rhinitis in tortoises.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Orlando, Florida, USA, pp. 101-102.

ORIGGI, F. C., KLEIN, P. A., MATHES, K., BLAHAK, S., MARSCHANG, R. E., TUCKER, S. J. und JACOBSON, E. R. (2001b):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting herpesvirus exposure in Mediterranean tortoises (spur-thighed tortoise [*Testudo graeca*] and Hermann's tortoise [*Testudo hermanni*]).

Journal of Clinical Microbiology **39**:9, 3156-3163.

PAPADI, G. P., BALAZS, G. H. und JACOBSON, E. R. (1995):

Flow cytometric DNA content analysis of fibropapillomas in green turtles *Chelonia mydas*.

Diseases of Aquatic Organisms **22**:1, 13-18.

PENNER, J. D., JACOBSON, E. R., BROWN, D. R., ADAMS, H. P. und BESCH-WILLIFORD, C. L. (1997):

A novel Mycoplasma sp. associated with proliferative tracheitis and pneumonia in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*).

Journal of Comparative Pathology **117**:3, 283-288.

PETTAN, K. C. B., DREW, M. E., RAMSAY, E. und LOWENSTINE, L. J. (1991):

Herpesvirus-like particles associated with respiratory disease in a California desert tortoise (*Xerobates agassizii*).

Proceedings Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), pp. 157-158.

PETTAN-BREWER, K. C. B., DREW, M. L., RAMSAY, E., MOHR, F. C. und LOWENSTINE, L. J. (1996):

Herpesvirus particles associated with oral and respiratory lesions in a california desert tortoise (*Gopherus agassizii*).

Journal of Wildlife Diseases **32**, 521-526.

PIEH, A. (in Bearbeitung):

Innerartliche und geographische Variabilität der Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca* Linnaeus, 1758) in Nordafrika mit Reflexion über das historisch-geographische Zustandekommen des rezenten nordafrikanischen Verbreitungsbildes und einer kommentierten Liste der außerafrikanischen Taxa.

Biologie Diss., Universität Leipzig, Abteilung für spezielle Zoologie und Staatliches Naturkundemuseum Dresden, Leipzig, Deutschland.

PIEH, A. und PERÄLÄ, J. (2003 - im Druck):

Variabilität der Landschildkröte aus dem Komplex von *Testudo graeca* Linnaeus, 1758 in Zentralmarokko und im nordwestlichen Marokko mit Beschreibung zweier neuer Taxa.

Herpetozoa.

POSTHAUS, H., MARSCHANG, R. E., GRAVENDYCK, M. und BACCIARINI, L. N. (1997):

Study on herpesvirus infections in land tortoises in Switzerland.

Proceedings Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), Houston, Texas, USA, pp. 17-18.

PREZANT, R. M., ISAZA, R. und JACOBSON, E. R. (1994):

Plasma concentrations and disposition kinetics of enrofloxacin in Gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*).

Journal of Zoo and Wildlife Medicine **25**:1, 82-87.

QUACKENBUSH, S. L., CASEY, R. N., MURCEK, R. J., PAUL, T. A., WORK, T. M., LIMPUS, C. J., CHAVES, A., DUTOIT, L., PEREZ, J. V., AGUIRRE, A. A., SPRAKER, T. R., HORROCKS, J. A., VERMEER, L. A., BALAZS, G. H. und CASEY, J. W. (2001):

Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real-time PCR.

Virology **287**:1, 105-111.

QUESENBERRY, K. E., JACOBSON, E. R., ALLEN, J. L. und COOLEY, A. J. (1986):

Ulcerative stomatitis and subcutaneous granulomas caused by *Mycobacterium chelonae* in a *Boa constrictor*.

Journal of the American Veterinary Medical Association **189**:9, 1131-1132.

RAPHAEL, B. L., PAPICH, M. und COOK, R. A. (1994):

Pharmacokinetics of enrofloxacin after a single intramuscular injection in Indian star tortoises (*Geochelone elegans*).

Journal of Zoo and Wildlife Medicine **25**:1, 88-94.

RAYNAUD, A. (1982):

Virus de type herpesvirus associe a des papillons cutanes chez *Lacerta viridis* (Laur.).

Comptes Rendus du Premier Colloque International de Pathologie des Reptiles et des Amphibiens, Angers, France, pp. 115-122.

RAZIN, S. (1981):

Mycoplasmas: The smallest pathogenic procaryotes.

Israel Journal of Medical Sciences **17**, 510-515.

RAZIN, S. (1992):

Mycoplasma taxonomy and ecology. In: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Maniloff, J., R. McElhaney, L. R. Finch, und J. B. Baseman (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, pp. 1-17.

RAZIN, S., YOGEV, D. und NAOT, Y. (1998):

Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.  
Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**:4, 1094-1156.

REBELL, G., RYWLIN, A. und HAINES, H. (1975):

A herpesvirus-type agent associated with skin lesions of green sea turtles in aquaculture.  
American Journal of Veterinary Research **36**:08, 1221-1224.

REICHENBACH-KLINKE, H.-H. und ELKAN, E. (1966):

The principal diseases of lower vertebrates.  
Academic Press, New York, USA.

REME, A. (1980):

Quelques problèmes sanitaires et pathologiques dans l'élevage intensif de la tortue marine (*Chelonia mydas*, L.) à La Réunion.  
Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux **33**:2, 177-192.

ROBERTS, M. C. (1992):

Antibiotic resistance. In: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Maniloff, J., R. McElhaney, L. R. Finch, und J. B. Baseman (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, pp. 513-521.

ROIZMAN, B. (1996):

*Herpesviridae*. In: Fields Virology. Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, und S. E. Straus (eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, pp. 2221-2230.

ROSS, R. A. und MARZEC, G. (1984):

The bacterial diseases of reptiles.  
Institut for Herpetological Research, Stanford, California, USA, p. 114.

ROSSKOPF, J., WALTER J. (1990):

The upper respiratory syndrome in captive desert tortoises: Diagnosis, treatment and management.  
Proceedings First International Symposium on Turtles and Tortoises: Conservation and Captive Husbandry, Chapman University, USA, p. 107.

ROSSKOPF, W. J., HOWARD, A. P. und GENDRON, E. (1981):

Mortality studies on *Gopherus agassizii* and *Gopherus berlandieri* tortoises.  
Proceedings of the Desert Tortoise Council Symposium, Palm Springs, California, USA, pp. 108-112.

ROTHER, F. und AMBROSIUS, H. (1968):

Beitrag zur Immunbiologie poikilothermer Wirbeltiere, V. Die Proliferation Antikörper bildender Zellen bei Schildkröten.  
Acta Biologica et Medica Germanica **21**:4, 525-536.

SABIN, A. B. (1941a):

The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group.  
Bacteriological Reviews **5**, 1-66.

SABIN, A. B. (1941b):

The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group (appendix on classification and nomenclature).

Bacteriological Reviews **5**, 331-335.

SAMUEL, M. D., GOLDBERG, D. R., THOMAS, C. B., SHARP, P., ROBB, J. R., KRAPU, G. L., NERSESSIAN, B. N., KENOW, K. P., KORSCHGEN, C. E., CHIPLEY, W. H. und CONROY, M. J. (1996):

Exposure of wild waterfowl to *Mycoplasma anatis*.

Journal of Wildlife Diseases **32**:2, 331-337.

SCHMIDT, A. (2000):

Herpesvirusinfektionen der Reptilien: Literaturübersicht und Untersuchung zum Vorkommen in Deutschland.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland, p. 96.

SCHROEDER, H.-D. und SCHUETT, W. (1997):

Beitrag zu den bakteriellen und mykotischen Erkrankungen der Schildkröten.

Verhandlungsbericht des 38. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, Schweiz, pp. 35-37.

SCHULZE, P. M. (2000):

Beschreibende Statistik.

Schulze, P. M. (ed.). Oldenbourg Verlag, München, Deutschland, 4. Auflage, p. 396.

SCHUMACHER, I. M., BROWN, M. B., JACOBSON, E. R., COLLINS, B. R. und KLEIN, P. A. (1992):

Studies on an upper respiratory tract disease in free-ranging desert tortoises (*Gopherus agassizii*).

Proceedings 1<sup>st</sup> International Congress of Chelonian Pathology, Gonfaron, France, pp. 121-123.

SCHUMACHER, I. M., BROWN, M. B., JACOBSON, E. R., COLLINS, B. R. und KLEIN, P. A. (1993):

Detection of antibodies to a pathogenic mycoplasma in desert tortoises (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease.

Journal of Clinical Microbiology **31**:6, 1454-1460.

SCHUMACHER, I. M., HARDENBROOK, D. B., BROWN, M. B., JACOBSON, E. R. und KLEIN, P. A. (1997):

Relationship between clinical signs of upper respiratory tract disease and antibodies to *Mycoplasma agassizii* in desert tortoises from Nevada.

Journal of Wildlife Diseases **33**:2, 261-266.

SCHUMACHER, I. M., MCLAUGHLIN, G. S., JACOBSON, E. R., BROWN, M. B., KLEIN, P. A. und BROWN, D. R. (1996):

Diagnostics of mycoplasma infections of tortoises: Applications for management and conservation.

Proceedings Health Profiles, Reference Intervals and Diseases of Desert tortoises, CSU Desert Studies Center at Soda Springs, California, USA, pp. 53-66.

SCHUMACHER, I. M., ROSTAL, D. C., YATES, R. A., BROWN, D. R., JACOBSON, E. R. und KLEIN, P. A. (1999):

Persistence of maternal antibodies against *Mycoplasma agassizii* in desert tortoise hatchlings.

American Journal of Veterinary Research **60**:7, 826-831.

SCHUMACHER, J. (1996):

Viral diseases (Special topics). In: Reptile Medicine and Surgery. Mader, D. R. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, pp. 226-234.

SCHUMACHER, J. (2000):

Viral diseases in reptiles. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIII. Small Animal Practice. Thirteenth Edition, Bonagura, J. D. (ed.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 1174-1176.

SELBITZ, H.-J. (2002):

Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage, Rolle, M. und A. Mayr (eds.). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 417-588.

SIMECKA, J. W., DAVIS, J. K., DAVIDSON, M. K., ROSS, S. E., STÄDTLANDER, C. T. K.-H. und CASSELL, G. H. (1992):

Mycoplasma diseases of animals. In: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Maniloff, J., R. McElhaney, L. R. Finch, und J. B. Baseman (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, pp. 391-415.

SMITH, G. M. und COATES, C. W. (1938):

Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus).  
Zoologica **23**, 93-98.

SMITH, G. M. und COATES, C. W. (1939):

The occurrence of trematode ova (*Haplotrema constrictum*) (Leared) in fibro-epithelial tumors of the marine turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus).  
Zoologica **24**, 379-382.

SNIPES, K. P. (1984):

Pasteurella in reptiles. In: Diseases of Amphibians and Reptiles. Hoff, G. L., F. L. Frye, und E. R. Jacobson (eds.). Plenum Press, New York, USA, pp. 25-35.

SNIPES, K. P. und BIBERSTEIN, E. L. (1982):

*Pasteurella testudinis* sp. nov.: A parasite of desert tortoises.  
International Journal of Systematic Bacteriology **32**:2, 201-210.



SNIPES, K. P., BIBERSTEIN, E. L. und FOWLER, M. E. (1980):

A *Pasteurella* spp. associated with respiratory disease in captive desert tortoises.

Journal of the American Veterinary Medical Association **177**:9, 804-807.

SNIPES, K. P., KASTEN, R. W., CALAGOAN, J. M. und BOOTHBY, J. T. (1995):

Molecular characterization of *Pasteurella testudinis* isolated from desert tortoises (*Gopherus agassizii*) with and without upper respiratory tract disease.

Journal of Wildlife Diseases **31**:1, 22-29.

SPÖRLE, H., GÖBEL, T. und SCHILDGER, B. J. (1991):

Blood-levels of some antiinfectives in the Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*).

Proceedings 4<sup>th</sup> International Colloquium on Pathology and Medicine of Reptiles and Amphibians, Bad Nauheim, Deutschland, pp. 120-128.

STRAUB, J. (2002):

Zur aeroben Bakterienflora von Kornea, Rachen und Kloake vor und nach der Winterruhe von Landschildkröten der Arten *Testudo* (*T.*) *hermanni*, *T. graeca*, *T. marginata* und *T. horsfieldii*.

Vet. Med. Diss., Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Deutschland, p. 134.

TAYLOR-ROBINSON, D. (1995):

Mycoplasma and ureoplasma. In: Manual of Clinical Microbiology. Sixth Edition, Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, und R. H. Tenover (eds.). American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., USA, pp. 652-661.

TEIFKE, J. P., LOHR, C. V., MARSCHANG, R. E., OSTERRIEDER, N. und POSTHAUS, H. (2000):

Detection of chelonid herpesvirus DNA by nonradioactive in situ hybridization in tissues from tortoises suffering from stomatitis-rhinitis-complex in Europe and North America.  
Veterinary Pathology **37**:5, 377-385.

TULLY, J. G. (1983):

New laboratory techniques for isolation of *Mycoplasma pneumoniae*.  
Yale Journal of Biology and Medicine **56**:5-6, 511-515.

TULLY, J. G., ROSE, D. L., WHITCOMB, R. F. und WENZEL, R. P. (1979):

Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly-modified culture medium.  
Journal of Infectious Diseases **139**:4, 478-482.

TULLY, J. G., TAYLOR-ROBINSON, D., ROSE, D. L., FURR, P. M. und HAWKINS, D. A. (1983):

Evaluation of culture media for the recovery of *Mycoplasma hominis* from the human urogenital tract.  
Sexually Transmitted Disease **10**:4 Suppl, 256-260.

UNE, Y., MURAKAMI, M., UEMURA, K., FUJITANI, H., ISHIBASHI, T. und NOMURA, Y. (2000):

Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of herpesvirus in tortoises.  
Journal of Veterinary Medical Science **62**:8, 905-907.

UNE, Y., UEMURA, K., NAKANO, Y., KAMIIE, J., ISHIBASHI, T. und NOMURA, Y. (1999):

Herpesvirus infection in tortoises (*Malacochersus tornieri* and *Testudo horsfieldii*).  
Veterinary Pathology **36**:6, 624-627.

VAN KUPPEVELD, F. J., VAN DER LOGT, J. T., ANGULO, A. F., ZOEST, M. J., QUINTW.G.V., NIESTERS, H. G. M., GALAMA, J. M. und MELCHERS, W. J. (1992):

Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification.

Applied and Environmental Microbiology **58**:8, 2606-2615.

VANROMPAY, D., DE MEURICHY, W., DUCATELLE, R. und HAESEBROUCK, F. (1994):

Pneumonia in Moorish tortoises (*Testudo graeca*) associated with avian serovar A *Chlamydia psittaci*.

The Veterinary Record **135**:12, 284-285.

VIX, M. und JAROFKE, D. (1997):

Viruskrankheiten der Reptilien.

Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, Schweiz, Vol. 38, pp. 17-24.

WAGNER, E. K. (1974):

The replication of herpes viruses.

American Scientist **62**:5, 548-593.

WALLACH, J. D. (1969):

Medical care of reptiles.

Journal of the American Veterinary Medical Association **155**:7, 1017-1034.

WENKER, C., POSTHAUS, H., HÄFELI, W., BAUMGARTNER, R. und ISENBÜGEL, E. (1997):

Parese der Hintergliedmassen bei Schildkröten und Echsen - ausgewählte Fälle und Versuch einer diagnostischen Annäherung.

Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, Schweiz, 38, pp. 51-56.

WESTHOUSE, R. A., JACOBSON, E. R., HARRIS, R. K., WINTER, K. R. und HOMER, B. L. (1996):

Respiratory and pharyngo-esophageal iridovirus infection in a gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*).

Journal of Wildlife Diseases **32**:4, 682-626.

WILLETTE-FRAHM, M. (1995):

Blood collection techniques in amphibians and reptiles. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice. Twelfth Edition, Kirk, R. W. und J. D. Bonagura (eds.). W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 1344-1348.

WITTE, A. (1992):

Detection of antibodies against Sendai virus and Paramyxo-7-like-virus in landtortoises.

Proceedings 1<sup>st</sup> International Congress of Chelonian Pathology, Gonfaron, France, pp. 124-135.

WITTE, A. und BLAHAK, S. (1993):

Ein Beitrag zum Nachweis von Antikörpern gegen Herpes- und Paramyxoviren bei verschiedenen Landschildkrötenarten.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland, p. 94.

WORK, T. M., RAMEYER, R. A., BALAZS, G. H., CRAY, C. und CHANG, S. P. (2001):

Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii.

Journal of Wildlife Diseases **37**:3, 574-581.

YU, Q., HU, N., LU, Y., NERURKAR, V. R. und YANAGIHARA, R. (2001):

Rapid acquisition of entire DNA polymerase gene of a novel herpesvirus from green turtle fibropapilloma by a genomic walking technique.

Journal of Virological Methods **91**:2, 183-195.

YU, Q., LU, Y., NERURKAR, V. R. und YANAGIHARA, R. (2000):

Amplification and analysis of DNA flanking known sequences of a novel herpesvirus from green turtles with fibropapilloma Brief report.

Archives of Virology **145**:12, 2669-2676.

ZWART, P. und BUITELAAR, M. (1980):

*Candida tropicalis*: infections and their treatment in chelonians.

Proceedings Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), Columbus, Ohio, USA, pp. 58-59.

## 9 Anhang

AD1 = Adaptationsgehege, Gehege zur Aufnahme der gerade im Schildkrötendorf angekommenen *Testudo hermanni* hermanni; G = Geschlecht; G.A. = gerade im Schildkrötendorf angekommene Schildkröten; ID = Identifizierung der untersuchten Schildkröten; J = juvenil; M = männlich; Marrak = in Marrakesch gefundene Schildkröten; Mykoplasma = Mykoplasmen; R1 bis R3 = Gehege der adulten *Testudo hermanni hermanni*; SA = Gehege der juvenilen *Testudo hermanni hermanni* („Subadulte“); TGG = *Testudo graeca graeca*; TGG 2 und 3 = Gehege der *Testudo graeca graeca*; ; TGG N = Gehege der juvenilen TGG („Nurserie“); TGI = *Testudo graeca ibera*, bzw. Gehege der *Testudo graeca ibera*; THH = *Testudo hermanni hermanni*; W = weiblich; - = negativ (Spezifitätsgrenze < 1)

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
96-1	TGG	1544	W	Klinik	negativ	-	-	-	0,94	negativ	negativ
96-2	TGG	1620	M	G.A.	negativ	-	-	-	1,10	negativ	negativ
96-3	TGG	1618	W	G.A.	negativ	-	-	-	0,92	negativ	negativ
96-4	TGG	1619	W	G.A.	negativ	-	-	-	1,06	negativ	negativ
96-5	TGG	1621	M	G.A.	negativ	-	-	-	1,68	negativ	negativ
96-6	TGG	811	W	TGG 3	negativ	362	181	45	6,20	positiv	negativ
96-7	TGG	1623	M	G.A.	negativ	-	-	-	10,82	positiv	negativ
96-8	TGI	1622	M	G.A.	negativ	-	-	-	5,63	positiv	negativ
96-9	TGG	1632	W	G.A.	negativ	-	-	-	12,11	positiv	positiv
96-12	TGG	1624	W	G.A.	negativ	-	-	-	2,58	fraglich	negativ
96-13	TGG	1629	M	G.A.	negativ	-	-	-	12,86	positiv	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
96-14	TGI	1628	W	G.A.	negativ	-	-	-	10,44	positiv	negativ
96-15	TGG	1625	W	G.A.	negativ	-	-	-	1,01	negativ	negativ
96-16	TGG	1627	M	G.A.	negativ	91	45	32	1,13	negativ	negativ
96-17	TGI	1626	M	G.A.	negativ	-	-	-	1,33	negativ	negativ
96-18	TGG	unmarkiert	W	TGG N	negativ	-	-	-	1,49	negativ	negativ
96-19	TGG	1565	M	TGG N	negativ	-	-	-	1,15	negativ	negativ
96-20	TGG	1280	W	TGG N	negativ	6	3	-	9,59	positiv	negativ
96-21	TGG	1630	W	G.A.	negativ	-	-	-	3,59	positiv	negativ
96-22	THH	0000627E0B	W	R1	negativ	-	-	-	1,28	negativ	negativ
96-23	THH	000096498D	W	R1	negativ	-	-	-	1,60	negativ	negativ
96-24	THH	0000650B45	W	R1	negativ	-	-	-	1,60	negativ	negativ
96-25	THH	000062W9E9	W	R1	negativ	-	-	-	1,38	negativ	negativ
96-26	THH	00009701BE	W	R1	negativ	-	-	-	2,27	fraglich	negativ
96-27	THH	00002285E6	M	R1	negativ	-	-	-	2,36	fraglich	negativ
96-28	THH	0000242404	M	R1	negativ	-	-	-	1,69	negativ	negativ
96-29	THH	000062CCE9	M	R1	negativ	-	-	-	1,43	negativ	negativ
96-30	THH	0000774C5A	M	R1	negativ	-	-	-	2,31	fraglich	negativ
96-31	THH	0000965160	M	R1	negativ	-	-	-	1,68	negativ	negativ
96-32	THH	00000W747E	M	R1	negativ	-	-	-	1,63	negativ	negativ
96-33	THH	00001D4W86	M	R1	negativ	-	-	-	1,56	negativ	negativ
96-34	THH	000096WE8W	M	R1	negativ	-	-	-	1,72	negativ	negativ
96-35	THH	0001BB90DA	M	R1	negativ	-	-	-	1,97	negativ	negativ
96-36	THH	0000704B3B	M	R1	negativ	-	-	-	5,08	positiv	negativ
96-37	THH	0000970WC6	W	R1	negativ	-	-	-	1,30	negativ	negativ
96-38	THH	0000630B82	W	R1	negativ	-	-	-	1,05	negativ	negativ
96-39	THH	000063076B	W	R1	negativ	-	-	-	1,30	negativ	negativ
96-40	THH	000070539E	W	R1	negativ	-	-	-	2,48	fraglich	negativ
96-41	THH	0000970CD0	W	R1	negativ	-	-	-	2,52	fraglich	negativ
96-42	THH	00001CD6AE	M	R3	negativ	-	-	-	1,47	negativ	negativ
96-43	THH	00003C58C7	M	R3	negativ	-	-	-	1,89	negativ	negativ
96-44	THH	00001A18EA	M	R3	negativ	-	-	-	2,51	fraglich	negativ
96-45	THH	000010AW6A	M	R3	negativ	-	-	-	1,27	negativ	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
96-46	THH	00001A32D2	M	R3	negativ	-	-	-	2,42	fraglich	negativ
96-47	THH	00000W60B8	W	R3	negativ	-	-	-	1,89	negativ	negativ
96-48	THH	00001AD3B2	W	R3	negativ	-	-	-	1,82	negativ	negativ
96-49	THH	0000112W99	W	R3	negativ	-	-	-	1,25	negativ	negativ
96-50	THH	00001A1193	W	R3	negativ	-	-	-	1,41	negativ	negativ
96-51	THH	00000W684A	W	R3	negativ	-	-	-	1,34	negativ	negativ
96-52	THH	000062AE34	W	R2	negativ	-	-	-	1,78	negativ	negativ
96-53	THH	000010B2BW	W	R2	negativ	-	-	-	1,08	negativ	negativ
96-54	THH	0000774940	W	R2	negativ	-	-	-	2,40	fraglich	negativ
96-55	THH	0000628015	W	R2	negativ	-	-	-	3,02	positiv	negativ
96-56	THH	000013E820	W	R2	negativ	-	-	-	1,59	negativ	negativ
96-57	THH	0000964A0W	M	R2	negativ	-	-	-	3,62	positiv	negativ
96-58	THH	0000775878	M	R2	negativ	-	-	-	1,37	negativ	negativ
96-59	THH	00001A1125	M	R2	negativ	-	-	-	1,97	negativ	negativ
96-60	THH	000063095D	M	R2	negativ	-	-	-	1,59	negativ	negativ
96-61	THH	000062CCB3	M	R2	negativ	-	-	-	1,41	negativ	negativ
96-62	THH	CLIP A997	M	AD1	negativ	-	-	-	0,85	negativ	negativ
96-63	THH	CLIP A975	M	AD1	negativ	-	-	-	1,07	negativ	negativ
96-64	THH	CLIP A901	M	AD1	negativ	-	-	-	1,37	negativ	negativ
96-65	THH	CLIP A993	M	AD1	negativ	-	-	-	1,05	negativ	negativ
96-66	THH	CLIP A983	M	AD1	negativ	-	-	-	1,56	negativ	negativ
96-67	THH	CLIP A973	M	AD1	negativ	-	-	-	1,05	negativ	negativ
96-68	THH	CLIP A976	M	AD1	negativ	-	-	-	0,94	negativ	negativ
96-69	THH	CLIP A994	M	AD1	negativ	-	-	-	0,96	negativ	negativ
96-70	THH	CLIP A978	M	AD1	negativ	-	-	-	1,29	negativ	negativ
96-71	THH	CLIP A959	M	AD1	negativ	-	-	-	0,94	negativ	negativ
96-72	THH	CLIP A960	W	AD1	negativ	-	-	-	1,03	negativ	negativ
96-73	THH	CLIP A967	W	AD1	negativ	-	-	-	1,54	negativ	negativ
96-74	THH	CLIP A986	W	AD1	negativ	-	-	-	0,91	negativ	negativ
96-75	THH	CLIP A966	W	AD1	negativ	-	-	-	5,35	positiv	negativ
96-76	THH	CLIP A984	W	AD1	negativ	-	-	-	0,87	negativ	negativ
96-77	THH	CLIP A991	W	AD1	negativ	-	-	-	1,32	negativ	negativ



Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
96-78	THH	CLIP A988	W	AD1	negativ	-	-	-	0,98	negativ	negativ
96-79	THH	CLIP A961	W	AD1	negativ	-	-	-	0,99	negativ	negativ
96-80	THH	CLIP A987	W	AD1	negativ	-	-	-	1,09	negativ	negativ
96-81	THH	CLIP A899	W	AD1	negativ	-	-	-	1,79	negativ	negativ
96-82	TGG	1180	W	TGG 3	negativ	23	45	23	13,89	positiv	negativ
96-83	TGG	1307	W	TGG 3	negativ	64	32	23	12,44	positiv	negativ
96-84	TGG	1373	W	TGG 3	negativ	-	-	-	13,45	positiv	negativ
96-85	TGG	1452	W	TGG 3	negativ	-	-	-	4,16	positiv	positiv
96-86	TGG	1575	W	TGG 3	negativ	-	-	-	5,07	positiv	positiv
96-87	TGG	1521	W	TGG 3	negativ	-	-	-	4,86	positiv	negativ
96-88	TGG	1601	W	TGG 3	negativ	-	-	-	5,71	positiv	negativ
96-89	TGG	1528	W	TGG 3	negativ	-	-	-	4,95	positiv	negativ
96-90	TGG	1561	W	TGG 3	negativ	-	-	-	1,35	negativ	negativ
96-91	TGG	231	W	TGG 3	negativ	64	23	45	16,28	positiv	negativ
96-92	TGG	1110	W	TGG 3	negativ	-	-	-	8,77	positiv	negativ
96-93	TGG	1236	W	TGG 3	negativ	-	-	-	16,27	positiv	negativ
96-94	TGG	1341	W	TGG 3	negativ	91	11	64	5,83	positiv	negativ
96-95	TGG	1414	W	TGG 3	negativ	-	-	-	3,10	positiv	positiv
96-96	TGG	1462	W	TGG 3	negativ	-	-	-	15,47	positiv	negativ
96-97	TGG	1466	W	TGG 3	negativ	-	-	-	6,47	positiv	negativ
96-98	TGG	1405	W	TGG 3	negativ	-	-	-	7,80	positiv	negativ
96-99	TGI	1634	M	G.A.	negativ	-	-	-	1,15	negativ	negativ
96-100	TGG	1633	M	G.A.	negativ	-	-	-	9,88	positiv	negativ
96-101	TGG	227	M	TGG 2	negativ	362	45	45	4,36	positiv	negativ
96-102	TGG	228	M	G.A.	negativ	362	181	181	2,67	fraglich	negativ
96-103	TGG	252	M	TGG 2	negativ	45	6	6	8,33	positiv	negativ
96-104	TGG	333	M	TGG 2	negativ	32	11	23	7,14	positiv	negativ
96-105	TGG	739	M	TGG 2	negativ	-	-	-	9,18	positiv	negativ
96-106	TGG	830	M	TGG 2	negativ	724	23	91	13,25	positiv	negativ
96-107	TGG	831	M	TGG 2	negativ	23	6	11	15,93	positiv	negativ
96-108	TGG	1226	M	TGG 2	negativ	91	11	16	13,88	positiv	negativ
96-109	TGG	1311	M	TGG 2	negativ	45	23	23	7,93	positiv	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
96-110	TGG	1345	M	TGG 2	negativ	23	11	32	5,22	positiv	negativ
96-111	TGG	1491	M	TGG 2	negativ	-	-	-	3,25	positiv	negativ
96-112	TGG	1493	M	TGG 2	negativ	-	-	-	2,20	fraglich	negativ
96-113	TGG	1494	M	TGG 2	negativ	-	-	-	3,10	positiv	negativ
96-114	TGG	1495	M	TGG 2	negativ	-	-	-	2,32	fraglich	negativ
96-115	TGG	1497	M	TGG 2	negativ	-	-	-	1,74	negativ	negativ
96-116	TGI	221	W	TGI	negativ	362	45	23	3,65	positiv	negativ
96-117	TGI	278	W	TGI	negativ	181	181	91	3,62	positiv	negativ
96-118	TGI	349	W	TGI	negativ	64	32	64	4,15	positiv	positiv;neu
96-119	TGI	1149	W	TGI	negativ	181	32	64	10,49	positiv	negativ
96-120	TGI	1184	W	TGI	negativ	128	23	23	15,31	positiv	positiv;neu
96-121	TGI	1318	W	TGI	negativ	181	32	23	10,54	positiv	positiv
96-122	TGI	1456	W	TGI	negativ	-	-	-	11,99	positiv	negativ
96-123	TGI	1485	W	TGI	negativ	181	16	64	9,75	positiv	negativ
96-124	TGI	1510	W	TGI	negativ	45	16	32	3,02	positiv	negativ
96-125	TGI	1542	W	TGI	negativ	45	8	-	1,51	negativ	negativ
96-126	TGI	1567	W	TGI	negativ	-	-	-	2,44	fraglich	negativ
96-127	TGI	1599	W	TGI	negativ	-	-	-	2,01	fraglich	negativ
96-128	TGI	1618	W	TGI	negativ	45	6	4	1,13	negativ	negativ
96-129	TGG	1564	M	TGG 2	negativ	-	-	-	1,57	negativ	negativ
96-130	TGG	1572	M	TGG 2	negativ	-	-	-	3,40	positiv	negativ
96-134	TGG	1636	W	G.A.	negativ	-	-	-	1,49	negativ	negativ
96-135	TGI	146	M	TGI	negativ	91	11	11	3,53	positiv	negativ
96-136	TGI	805	M	TGI	negativ	362	45	91	8,79	positiv	negativ
96-137	TGI	869	M	TGI	negativ	64	16	11	11,35	positiv	positiv;neu
96-138	TGI	1134	M	TGI	negativ	181	45	45	7,36	positiv	negativ
96-139	TGI	1209	M	TGI	negativ	362	45	45	9,85	positiv	negativ
96-140	TGI	1275	M	TGI	negativ	23	23	23	3,34	positiv	negativ
96-141	TGI	1310	M	TGI	negativ	45	91	45	9,58	positiv	negativ
96-142	TGI	1382	M	TGI	negativ	23	45	16	2,24	fraglich	negativ
96-143	TGI	1410	M	TGI	negativ	23	11	11	4,52	positiv	negativ
96-144	TGI	1421	M	TGI	negativ	8	8	4	4,99	positiv	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
96-146	TGG	1637	W	G.A.	negativ	-	-	-	0,97	negativ	negativ
96-147	TGI	1638	M	G.A.	negativ	45	16	8	0,92	negativ	negativ
96-148	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	2,18	fraglich	negativ
96-149	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	2,99	fraglich	negativ
96-150	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	1,52	negativ	negativ
96-151	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	3,96	positiv	negativ
96-152	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	1,64	negativ	negativ
96-153	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	1,16	negativ	negativ
96-154	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	2,05	fraglich	negativ
96-155	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	2,21	fraglich	negativ
96-156	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	2,93	fraglich	negativ
96-157	THH		J	SA2/3	negativ	-	-	-	1,10	negativ	negativ
96-158	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	2,32	fraglich	negativ
96-159	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	1,02	negativ	negativ
96-160	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	1,15	negativ	negativ
96-161	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	1,63	negativ	negativ
96-162	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	1,53	negativ	negativ
96-163	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	1,74	negativ	negativ
96-164	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	2,07	fraglich	negativ
96-165	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	1,81	negativ	negativ
96-166	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	1,29	negativ	negativ
96-167	THH		J	SA2/4	negativ	-	-	-	3,41	positiv	negativ
96-168	TGG	1639	M	G.A.	negativ	-	-	-	10,52	positiv	negativ
96-169	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	1,16	negativ	negativ
96-170	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	0,87	negativ	negativ
96-171	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	1,50	negativ	negativ
96-172	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	1,17	negativ	negativ
96-173	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	1,20	negativ	negativ
96-174	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	1,39	negativ	negativ
96-175	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	1,16	negativ	negativ
96-176	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	0,93	negativ	negativ
96-177	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	0,79	negativ	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
96-178	THH		J	SA2/9	negativ	-	-	-	0,85	negativ	negativ
96-179	TGI	1640	M	G.A.	negativ	33	6	4	3,35	positiv	negativ
96-180	TGG	1615	M	G.A.	negativ	-	-	-	1,22	negativ	negativ
96-181	TGG	1641	W	G.A.	negativ	-	-	-	1,00	negativ	negativ
96-183	TGI	1644	W	G.A.	negativ	-	-	-	0,98	negativ	negativ
96-199	TGG	1647	W	G.A.	negativ	-	-	-	0,84	negativ	negativ
96-200	TGG	1643	M	G.A.	negativ	-	-	-	1,31	negativ	negativ
96-201	TGG	1646	M	G.A.	negativ	-	-	-	0,83	negativ	negativ
96-202	TGG	1645	M	G.A.	negativ	-	-	-	0,85	negativ	negativ
97-1	TGI	1695	W	TGI	positiv	135	9	9	1,31	negativ	negativ
97-2	THH	CLIP B554	M	V.B	negativ	-	-	-	1,16	negativ	negativ
97-3	THH	CLIP 447	M	V.B	negativ	-	-	-	0,9	negativ	negativ
97-4	THH	CLIP B553	W	V.B	negativ	-	-	-	3,39	positiv	negativ
97-5	THH	CLIP B552	W	V.B	negativ	-	-	-	3,34	positiv	negativ
97-6	THH	CLIP B551	M	V.B	negativ	-	-	-	1,74	negativ	negativ
97-7	THH	CLIP B556	W	V.B	negativ	-	-	-	0,88	negativ	negativ
97-8	THH	CLIP B555	W	V.B	negativ	-	-	-	1,4	negativ	negativ
97-9	THH	CLIP B559	M	V.B	negativ	-	-	-	0,93	negativ	negativ
97-10	THH	CLIP B570	W	V.B	negativ	-	-	-	1,11	negativ	negativ
97-11	THH	CLIP B569	W	V.B	negativ	-	-	-	1,46	negativ	negativ
97-12	THH	CLIP B568	W	V.B	negativ	-	-	-	0,77	negativ	negativ
97-13	THH	CLIP B561	W	V.B	negativ	-	-	-	1,42	negativ	negativ
97-14	THH	CLIP B566	W	V.B	negativ	-	-	-	0,9	negativ	negativ
97-15	THH	CLIP 449	M	V.B	negativ	-	-	-	2,33	fraglich	negativ
97-16	THH	CLIP B564	M	V.B	negativ	-	-	-	2,36	fraglich	negativ
97-17	THH	CLIP B571	M	V.B	negativ	-	-	-	1,03	negativ	negativ
97-18	THH	CLIP B562	M	V.B	negativ	-	-	-	1,95	negativ	negativ
97-19	THH	CLIP B567	M	V.B	negativ	-	-	-	0,89	negativ	negativ
97-20	THH	CLIP B565	M	V.B	negativ	-	-	-	0,97	negativ	negativ
97-21	THH	CLIP B572	M	V.B	negativ	-	-	-	0,96	negativ	negativ
97-22	THH	CLIP B573	M	V.B	negativ	-	-	-	2,89	fraglich	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
97-23	THH	CLIP B574	W	V.B	negativ	-	-	-	4,06	positiv	negativ
97-24	THH	CLIP B575	M	V.B	negativ	-	-	-	1,57	negativ	negativ
97-25	THH	CLIP B576	M	V.B	negativ	-	-	-	1	negativ	negativ
97-26	THH	CLIP B577	M	V.B	negativ	-	-	-	1,28	negativ	negativ
97-27	THH	CLIP B578	W	V.B	negativ	-	-	-	1,62	negativ	negativ
97-28	THH	CLIP B579	W	V.B	negativ	-	-	-	1,61	negativ	negativ
97-29	THH	CLIP B580	M	V.B	negativ	-	-	-	1	negativ	negativ
97-30	THH	CLIP B581	W	V.B	negativ	-	-	-	1,7	negativ	negativ
97-31	THH	CLIP B582	M	V.B	negativ	-	-	-	3,17	positiv	negativ
97-32	THH	CLIP B583	M	V.B	negativ	-	-	-	1,04	negativ	negativ
97-33	THH	CLIP B594	M	G.A.°	negativ	-	-	-	1,59	negativ	negativ
97-34	THH		M	G.A.°	negativ	-	-	-	5,09	positiv	negativ
97-35	THH	CLIP A568	W	THHyb	negativ	-	-	-	2,37	fraglich	negativ
97-36	THH	CLIP A805	M	CGAU	negativ	-	-	-	1,24	negativ	negativ
97-37	THH	CLIP B584	M	CGAU	negativ	-	-	-	1,02	negativ	negativ
97-38	THH	CLIP B585	W	CGAU	negativ	-	-	-	2,17	fraglich	negativ
97-39	THH	CLIP A806	M	CGAU	negativ	-	-	-	1,28	negativ	negativ
97-40	THH	CLIP A807	W	CGAU	negativ	-	-	-	1,81	negativ	negativ
97-41	THH	CLIP A799	W	CGAU	negativ	-	-	-	4,51	positiv	negativ
97-42	THH	CLIP A801	W	CGAU	negativ	-	-	-	2,05	fraglich	negativ
97-43	THH	CLIP B588	M	CGAU	negativ	-	-	-	1,17	negativ	negativ
97-44	THH	CLIP B587	M	CGAU	negativ	-	-	-	1,11	negativ	negativ
97-45	THH	CLIP B586	W	CGAU	negativ	-	-	-	2,27	fraglich	negativ
97-46	THH	CLIP B621	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,25	negativ	negativ
97-47	THH	CLIP B589	W	CGPO	negativ	-	-	-	3,74	positiv	negativ
97-48	THH	CLIP B590	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,26	negativ	negativ
97-49	THH	CLIP B622	W	CGPO	negativ	-	-	-	4,26	positiv	negativ
97-50	THH	CLIP B623	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,35	negativ	negativ
97-51	THH	CLIP B624	M	CGPO	negativ	-	-	-	1,82	negativ	negativ
97-52	THH	CLIP B625	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,21	negativ	negativ
97-53	THH	CLIP B626	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,72	negativ	negativ
97-54	THH	CLIP B627	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,32	negativ	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
97-55	THH	CLIP B628	W	CGAU	negativ	-	-	-	1,84	negativ	negativ
97-56	THH	CLIP B629	W	CGAU	negativ	-	-	-	1,58	negativ	negativ
97-57	THH	CLIP B630	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,61	negativ	negativ
97-58	THH	CLIP B638	W	CGPO	negativ	-	-	-	2,4	fraglich	negativ
97-59	THH	CLIP B640	W	CGPO	negativ	-	-	-	2,6	fraglich	negativ
97-60	THH	CLIP B639	W	CGPO	negativ	-	-	-	2,33	fraglich	negativ
97-61	THH	CLIP B637	W	CGPO	negativ	-	-	-	1,11	negativ	negativ
97-62	THH	CLIP B636	W	CGPO	negativ	-	-	-	3,5	positiv	negativ
97-63	THH	CLIP B635	W	CGPO	negativ	-	-	-	2,14	fraglich	negativ
97-64	THH	CLIP B634	M	CGPO	negativ	-	-	-	1,91	negativ	negativ
97-65	THH	CLIP B633	M	CGPO	negativ	-	-	-	1,11	negativ	negativ
97-66	THH	CLIP B632	M	CGPO	negativ	-	-	-	1,8	negativ	negativ
97-67	TGG	1 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	3,26	positiv	negativ
97-68	TGG	2 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	3,36	positiv	negativ
97-69	TGG	3 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	1,4	negativ	negativ
97-70	TGG	4 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,19	fraglich	negativ
97-71	TGG	5 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	3,46	positiv	negativ
97-72	TGG	7 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	1,94	negativ	negativ
97-73	TGG	8 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,32	fraglich	negativ
97-74	TGG	9 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	3,84	positiv	negativ
97-75	TGG	10 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,85	fraglich	negativ
97-76	TGG	11 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	3,27	positiv	negativ
97-77	TGG	12 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	3,93	positiv	negativ
97-78	TGG	13 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	2,65	fraglich	negativ
97-79	TGG	14 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	1,25	negativ	negativ
97-80	TGG	15 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	1,62	negativ	negativ
97-81	TGG	16 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,54	fraglich	negativ
97-82	TGG	18 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	4,41	positiv	negativ
97-83	TGG	17 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,72	fraglich	negativ
97-84	TGG	19 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,77	fraglich	negativ
97-85	TGG	20 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	7,13	positiv	negativ
97-86	TGG	21 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	1,59	negativ	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
97-87	TGG	22 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	4,23	positiv	negativ
97-88	TGG	23 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,68	fraglich	negativ
97-89	TGG	24 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	2,61	fraglich	negativ
97-90	TGG	25 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	5,54	positiv	negativ
97-91	TGG	26 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	4,37	positiv	negativ
97-92	TGG	27 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	8,89	positiv	negativ
97-93	TGG	28 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	6,55	positiv	negativ
97-94	TGG	29 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	1,56	negativ	negativ
97-95	TGG	30 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,84	fraglich	negativ
97-96	TGG	31 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	3,28	positiv	negativ
97-97	TGG	32 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	4,34	positiv	negativ
97-98	TGG	33 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	5,61	positiv	negativ
97-99	TGG	34 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	3,54	positiv	negativ
97-100	TGG	35 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,31	fraglich	negativ
97-101	TGG	36 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	1,91	negativ	negativ
97-102	TGG	37 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	2,48	fraglich	negativ
97-103	TGG	38 MA	W	Marrak	negativ	-	-	-	2,75	fraglich	negativ
97-104	TGG	39 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	1,98	negativ	negativ
97-105	TGG	42 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	2,52	fraglich	negativ
97-106	TGG	41 MA	M	Marrak	negativ	-	-	-	3,59	positiv	negativ
97-107	THH	CLIP B670	W	Colmal	negativ	-	-	-	1,08	negativ	negativ
97-108	THH	CLIP B631	W	Colmal	negativ	-	-	-	1,71	negativ	negativ
97-109	THH	CLIP B751	M	Colmal	negativ	-	-	-	2,16	fraglich	negativ
97-110	THH	CLIP 673	W	Colcap	negativ	-	-	-	1,29	negativ	negativ
97-111	THH	CLIP 681	M	Colcap	negativ	-	-	-	3,35	positiv	negativ
97-112	THH	CLIP 683	W	Colcap	negativ	-	-	-	1,54	negativ	negativ
97-113	THH	CLIP A484	W	Colcap	negativ	-	-	-	2,03	fraglich	negativ
97-114	THH	CLIP A451	M	Colcap	negativ	-	-	-	3,26	positiv	negativ
97-115	THH	CLIP A466	M	Colcap	negativ	-	-	-	1,48	negativ	negativ
97-116	THH	CLIP A471	W	Colcap	negativ	-	-	-	2,41	fraglich	negativ
97-117	THH	CLIP 679	W	Colcap	negativ	-	-	-	0,89	negativ	negativ
97-118	THH	CLIP A492	W	Colcap	negativ	-	-	-	1,29	negativ	negativ

Probe	Tierart	ID	G	Lokalität	Tupferprobe bukkal / kloakal	Herpes NT 770/95	Herpes NT 2245	Herpes NT*17/96	Mykoplasma ELISA Ratio	Ergebnis ELISA	Mykoplasma PCR
97-119	THH	CLIP A485	W	Colcap	negativ	-	-	-	2,67	fraglich	negativ
97-120	THH	CLIP A431	W	Colcap	negativ	-	-	-	1,84	negativ	negativ
97-121	THH	CLIP B752	W	Colchap	negativ	-	-	-	1,88	negativ	negativ
97-122	THH	CLIP B753	W	Colchap	negativ	-	-	-	1,31	negativ	negativ
97-123	THH	CLIP B754	M	Colchap	negativ	-	-	-	1,06	negativ	negativ
97-124	THH	CLIP B755	M	Colchap	negativ	-	-	-	1,66	negativ	negativ
97-125	THH	CLIP B756	M	Colchap	negativ	-	-	-	0,95	negativ	negativ
97-126	THH	CLIP B757	M	Colchap	negativ	-	-	-	0,91	negativ	negativ
97-127	THH	CLIP B758	M	Colchap	negativ	-	-	-	1,23	negativ	negativ
97-128	THH	CLIP B759	W	Colchap	negativ	-	-	-	4,02	positiv	negativ
97-129	THH	CLIP B760	W	Colchap	negativ	-	-	-	1,56	negativ	negativ
97-130	THH	CLIP B761	M	Colchap	negativ	-	-	-	0,86	negativ	negativ
97-131	THH	CLIP B762	M	Colchap	negativ	-	-	-	0,9	negativ	negativ
97-132	THH	CLIP B763	W	Colchap	negativ	-	-	-	0,88	negativ	negativ
97-133	THH	CLIP B764	M	Colchap	negativ	-	-	-	1	negativ	negativ
97-134	THH	CLIP B765	W	Colchap	negativ	-	-	-	1,06	negativ	negativ
97-135	THH	CLIP B766	W	Colchap	negativ	-	-	-	1,44	negativ	negativ
97-136	THH	CLIP B767	W	Colchap	negativ	-	-	-	0,95	negativ	negativ
97-137	THH	CLIP B768	M	Colchap	negativ	-	-	-	0,88	negativ	negativ
97-138	TGG	1757	M	G.A.°	negativ	-	-	-	10,04	positiv	negativ
97-139	TGG	1758	M	G.A.°	negativ	-	-	-	11,25	positiv	negativ
97-140	TGG	1660	W	TGG3	negativ	-	-	-	5,59	positiv	negativ
97-141	TGG	1632	M	TGG2	negativ	-	-	-	11,59	positiv	negativ
97-142	TGG	1534	M	TGG2	negativ	-	-	-	9,58	positiv	negativ
97-143	TGG	1611	M	TGG2	negativ	-	-	-	11,11	positiv	negativ
97-144	THH	1 BORMES	W	G.A.°	negativ	-	-	-	2,1	fraglich	negativ
97-145	THH	2 BORMES	W	G.A.°	negativ	-	-	-	6,8	positiv	negativ
97-150	THH	CLIP 21	W	Levant	negativ	-	-	-	3,82	positiv	negativ
97-151	THH	4419	W	Levant	negativ	-	-	-	7,7	positiv	negativ
97-152	THH	362	W	Levant	negativ	-	-	-	2,72	fraglich	negativ
97-153	THH	CLIP A 698	W	Levant	negativ	-	-	-	2,48	fraglich	negativ





## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. E. F. Kaleta danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. S. Blahak für ihre langjährige Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Arbeit bedanken. Ebenso danke ich ihr für die Einführung in die Reptilienvirologie und die Ermöglichung der Probenuntersuchung im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold. Dank auch an Dr. E. R. Jacobson für seinen Beistand und seine wertvollen Anregungen in diversen Gesprächen, in denen er mich an seinem enormen Wissen teilhaben ließ. Dank gilt ihm auch für die Ermöglichung der Arbeit an der Wildtierklinik und den anderen Instituten der Universität in Florida und für die stete Förderung meiner Begeisterung auf dem Gebiet der Reptilienmedizin. Ein herzliches Dankeschön an Dr. B. Fertard, der mich in Frankreich stark unterstützt hat. Ohne ihn und seine einmalige Geduld mit mir und meinen Französischkenntnissen v. a. zu Beginn dieser Studie wäre eine Verwirklichung dieser Arbeit nahezu undenkbar gewesen. Bedanken möchte ich mich auch bei Bernard Devaux, der durch seine unnachahmliche Art so manches Unmögliche möglich gemacht hat. Der S.O.P.T.O.M. und ihrem Komitee danke ich für die finanzielle Unterstützung von Teilen der vorliegenden Arbeit. Mein Dank gilt auch den Tierärzten und Wissenschaftlern Dr. D. R. Brown, Dr. I. M. Schumacher, Dr. M. B. Brown und Dr. P. A. Klein in Florida und Dr. W. Thiel in Detmold für die Bereitstellung ihrer Labore und für ihre Hilfe und Unterstützung dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Joe Tully für die Charakterisierung dreier im Zuge dieser Arbeit gefundenen Mykoplasmen-Isolate und bei Dr. D. Prager und Dr. R. Wurm für

die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen bedanken. Dr. R. Marschang danke ich für die konstruktive Durchsicht des Manuskriptes und so manch spannende Diskussion. Weiterhin gebührt mein Dank allen Mitarbeitern des Staatlichen Untersuchungsamtes in Detmold, vor allem der Abteilung Virologie und Pathohistologie und den Mitarbeitern des BEECS (Biotechnologies for the Ecological, Evolutionary and Conservation Sciences), der Zoo- und Wildtierabteilung, der Abteilung für infektiöse Krankheiten und für Veterinärpathologie der Universität von Florida. Dank gilt auch Denis Madec, Gerard Nouvel, Jean-Do Sabatier und allen „Stagiaires“ des Schildkrötendorfes, durch deren Eifer, gute Laune und Ideenreichtum vieles leichter wurde. Dank auch an Hermann, der wie kein zweiter unermüdlich und fröhlich manche noch so versteckte Schildkröte gefunden und stolz präsentiert hat. Ein dickes Danke auch an Kirsten Klug, die mich tatkräftig im Kampf mit der Statistik unterstützt hat. An dieser Stelle gebührt mein Dank auch Frau Dr. J. M. Wiechert für ihre zahlreichen konstruktiven Ratschläge und ihre immerwährende Hilfe, Unterstützung und Freundschaft ungeachtet von Entfernung und Uhrzeit. Chrisch, Jörn und Peter sei Dank für die unermüdliche Hilfe am Computer und in manch brenzlicher Situation. Meiner Familie und meinen Freunden gilt ein besonderer Dank für die tatkräftige und moralische, nie endende geduldige Unterstützung in allen Lebenslagen und auch während dieser Arbeit. Und natürlich meinen Dank an Tarah, daß sie treu an meiner Seite ist und daß sie so ist, wie sie ist. Dank an alle Zweibeiner und Vierbeiner, die durch ihre Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und deren Verwirklichung damit möglich gemacht haben.



